

Université de Sherbrooke

**LA MISE AU POINT D'UN TEST AU PCR POUR DÉTECTER *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* DANS LES SÉCRÉTIONS RESPIRATOIRES DES PATIENTS.**

Département de Microbiologie et d'infectiologie

Mémoire présenté à la faculté de médecine

par MELLE **MENGUE METOGHO RUTH**

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences ( M.Sc.)

en microbiologie.

21, novembre 1996



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-21803-1

À ma défunte mère Ntsame Assoumou Madeleine.

À mon cher grand frère Tomo Ernest.

## TABLE DES MATIÈRES

	Page
Table des matières.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
Résumé.....	IV
<b>1. HISTORIQUE ET CARACTÉRISATION.....</b>	<b>1</b>
1.1 LA TAXONOMIE DES CHLAMYDIAE.....	4
1.1.1 CLASSIFICATION HABITAT ET TRANSMISSION .....	4
1.1.2 AGENT ÉTIOLOGIQUE ET CYCLE DE CROISSANCE .....	6
1.1.3 LE CYCLE DE REPRODUCTION .....	6
<b>2. LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DE LA MEMBRANE EXTERNE.....</b>	<b>7</b>
2.1 PROTÉINE MAJEURE DE LA MEMBRANE EXTERNE (PPME):	
STRUCTURE ET SEQUENCE.....	8
2.2 GÉNÉTIQUE DU GENE PPME (PROTÉINE MAJEURE DE LA MEMBRANE EXTERNE).....	9
<b>3. ÉPIDÉMIOLOGIE.....</b>	<b>10</b>
<b>4. MANIFESTATIONS CLINIQUES.....</b>	<b>11</b>
<b>5. MÉTHODES DE DÉTECTION.....</b>	<b>14</b>



<b>6. PROJET</b>	<b>16</b>
<b>7. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>17</b>
7.1. AMPLIFICATION DE L'ADN PAR LA MÉTHODE DE "PCR" (POLYMERASE CHAIN REACTION)...	17
7.1.1 GÉNÉRALITÉS	17
7.1.2 MÉTHODES D'EXTRACTION D'ADN	19
7.1.2.1 MÉTHODES NAOH 80°C et 95°C	19
7.1.2.2 MÉTHODE LYSE-PROTÉINASE-K.	19
7.1.3 LES AMORCES	19
7.2 DIGESTION ET ÉLECTROPHORÈSE D'ADN	20
7.2.1 DIGESTION D'ADN AUX ENZYMES DE RESTRICTION	21
7.2.2 ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE.	21
7.2.3 ÉLECTROPHORÈSE D'ADN SUR GEL ACRYLAMIDE (SDS).	21
7.2.4 DIGESTION D'ADN À LA NUCLÉASE" MUNG BEAN"	22
7.3 PURIFICATION DE L'ADN	22
7.3.1 MÉTHODE "HIGH PURE PCR PRODUCT PURIFICATION"	22
7.3.2 MÉTHODE" FREEZE AND SQUEEZE"	23
7.3.3 TECHNIQUE DE RÉCUPÉRATION DE L'ADN AVEC LA MEMBRANE DEAE NA45	24
7.4. CLONAGE DE L'ADN	24
7.4.1. PLASMIDES OU VECTEURS DE CLONAGE	25
7.4.1.1 PLASMIDE pUC-PPME pneumoniae.	25
7.4.1.2 PLASMIDE pUC-AHD` 2LINKERS appelé plasmide pUC VECTEUR PCR	25
7.4.2 LIGATION.	26
7.4.3 PRÉPARATION DES BACTÉRIES COMPÉTENTES	27

7.4.4. ....	<i>TRANSFORMATION BACTÉRIENNE ET IDENTIFICATION DES PLASMIDES RECOMBINANTS</i> .....	27
7.4.5. MINIPRÉPARATION DES PLASMIDES.....		28
7.4.5.1 MÉTHODE PAR ÉBULLITION DE HOLMES ET QUIGLEY (1981) .....		28
7.4.5.2 MÉTHODE DÉCRITE PAR C. LEGOIUL ET AL., ( 1994).....		29
7.5 L'ADN DE L'INSERT .....		30
7.6 SÉQUENÇAGE.....		30
8. RÉSULTATS .....		31
8.1 ÉVALUATION DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION D'ADN LA MIEUX ADAPTÉE .....		32
8.2 LA MISE AU POINT DES CONDITIONS DE PCR .....		33
8.3 EFFET DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE $MgCl_2$ DU TAMPON HOT-TUB SUR LA SENSIBILITÉ DU PCR .....		33
8.4 EFFET DE LA CONCENTRATION DES dNTPs SUR LA SENSIBILITÉ DU PCR.....		34
8.5 TEST DE LA SENSIBILITÉ SUR LES DIFFÉRENTES PAIRES D'AMORCES .....		35
8.6 CONSTRUCTION DU TÉMOIN POSITIF "pUC-PPME LONG" .....		35
8.7. CONSTRUCTION DU TÉMOIN POSITIF "pUC-ADNr COURT" .....		38
8.7.1 CONSTRUCTION DU PLASMIDE UNIVERSEL pUC vecteur PCR.....		38
8.7.2 PRODUCTION DU TÉMOIN POSITIF puc-ADNr court par clonage du gène 16S ribosomal de <i>C.pneumoniae</i> dans puc vecteur PCR.....		42
8.8 DÉTECTION DE <i>C. PNEUMONIAE</i> DANS LES SÉCRÉTIIONS RESPIRATOIRES DES PATIENTS ..		44
8.9 TEST DE QUANTIFICATION DE L'ADN ISSUS DE QUATRE ÉCHANTILLONS DE PATIENTS POSITIFS, AMPLIFIÉS PAR PCR AVEC LES AMORCES Cpna ET CpnB .....		47
9. DISCUSSION.....		49

<b>CONCLUSION .....</b>	<b>57</b>
-------------------------	-----------

<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>58</b>
----------------------------	-----------

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1:** Amplification par PCR de l'ADN obtenu avec différentes méthodes

**Figure 2A:** Impact de la variation de la concentration de  $MgCl_2$  sur l'amplification par

**Figure 2B:** Impact de la variation de la concentration de  $MgCl_2$  sur l'amplification par PCR d'une préparation de *C. pneumoniae*.

**Figure 3:** Influence de la variation de la concentration des dNTPs sur l'amplification par PCR de *C. pneumoniae*:

**Figure 5:** Construction de pUC PPME long par clonage

**Figure 4:** Étude de la sensibilité des paires d'amorces sur les dilutions d'extraits bactériens.

**Figure 6:** Mise en évidence du clone ayant incorporé l'insert, à l'aide du profil des fragments d'ADN générés par Kpn1 sur les différentes colonies.

**Figure 7:** L'amplification par PCR avec les amorces CT11 et CT12 du plasmide portant le gène  $ppme^+$  de *C. pneumoniae* avec un insert de 280 pb ( piste 1) ou le plasmide original sans insert (piste 2).

**Figure 8:** Confirmation de l'identité du plasmide portant le gène  $ppme^+$  avec un insert de 280 pb par digestion de l'ADN amplifié avec les amorces CT12 et CT11 avec Msp1 et Alu1.

## LISTE DES FIGURES (SUITE)

**Figure 9:** Construction du clone positif pUC-ADNr par Clonage du petit fragment de 436 paires de bases du gène ribosomal 16S issu d'une amplification par PCR avec les amorces CpnB et CpnA dans le plasmide universel, pUC AhD<sup>+</sup> 2 adaptateurs.

**Figure 9A:** Construction du plasmide vecteur pUC-PCR

**Figure 9B:** Construction du plasmide pUC ADNr

**Figure 9C:** Construction de pUC ADNr court par délétion

**Figure 10:** Mise en évidence du plasmide ayant incorporé l'ADNr de *C. pneumoniae* à l'aide du profil des fragments d'ADN générés par EcoRI et HindIII sur les différentes colonies.

**Figure 11:** Electrophorèse sur gel d'agarose 1% qui confirme l'identité du clone pUC-ADNr par le traitement avec l'enzyme PvuII, la piste 2 contient le plasmide original; la piste 1, le clone portant l'ADN de l'ADNr de *C. pneumoniae*.

**Figure 12::** Electrophorèse sur gel d'acrylamide (12%) du produit d'amplification par PCR avec les amorces CpnB et CpnA du clone pUC-ADNr obtenu qui montre un fragment de 436 paires de bases (piste à droite de M), absent chez le plasmide d'origine (piste à gauche de M).

**Figure 13:** Mise en évidence par traitement avec EcoRI et HindIII d'un plasmide portant l'ADNr de *C. pneumoniae* ayant subi une délétion.

**Figure 14:** Electrophorèse sur gel d'agarose 2% qui confirme l'identité du clone pUC-ADNr par le traitement avec l'enzyme PvuII, la piste1, le clone pUC-ADNr court.

## LISTE DES FIGURES (SUITE ET FIN)

**Figure 15:** Electrophorèse sur gel d'agarose 2% du produit d'amplification par PCR avec les amorces CpnB et CpnA du clone pUC-ADNr court qui montre un fragment de 374 paires de bases (deux pistes à gauche), et du clone pUC ADNr dont est issu pUC-ADNr court et qui par amplification avec la même paire d'amorces, montre un fragment de 436 paires de base (deux pistes à droite).

**Figure 16:** Electrophorèse sur gel d'agarose 2% du produit d'amplification avec la paire d'amorces CpnA et CpnB d'une série d'échantillons.

**Figure 17:** Electrophorèse sur gel d'agarose 2% du produit d'amplification avec la paire d'amorces CpnA et CpnB des mêmes échantillons présentés à la figure 16 mais sans contrôle positif.

**Figure 18:** Electrophorèse sur gel d'agarose 1% du produit d'amplification du gène *ppme*<sup>+</sup> avec la paire d'amorces CT3B et CT8B, suivies de CT12 et CT5B, des échantillons présentés à la figure 16

**Figure 19:** Electrophorèse sur gel d'agarose 1% du produit d'amplification avec la paire d'amorces CT3B et CT8B suivies de CT12 et CT5B, des échantillons présentés à la figure 16, mais sans contrôle positif

**Figure 20:** La caractérisation de l'ADN amplifié à partir des sécrétions respiratoires des patients par PCR avec les amorces CT3b et CT8b, suivies de CT12 et CT5b.

**Figure 21:** Electrophorèse sur gel d'agarose 2% de la quantification de l'ADN de quatre échantillons des patients extraits par la méthode NaOH décrite au paragraphe 7.1.2.

**Figure 22:** Tableau comparatif des résultats d'analyse de la détection de *C. pneumoniae* chez 137 patients

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BSA</b>	Albumine de sérum bovin
<b>CEs</b>	Corps élémentaires
<b>CRs</b>	Corps réticulés
<b>dNTps</b>	Deoxynuclotide triphosphates
<b>HSP</b>	Heat shock protein
<b>Ig</b>	Immunoglobine
<b>IgA</b>	Immunoglobine A
<b>IbG</b>	Immunoglobine G
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>MOMP</b>	Protéine majeure de la membrane externe
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PPME</b>	Protéine majeure de la membrane externe

## RESUMÉ

Les maladies cardio-vasculaires sont responsables de 50% de la mortalité dans la plupart des pays industrialisés. Sur le banc des accusés: l'artériosclérose. Au terme des études épidémiologiques menées par les instituts de médecine sociale et préventive, il a été démontré que le facteur commun à la plupart de ces maladies cardio-vasculaires, entre autres l'infarctus myocardique, l'accident cérébrovasculaire, et l'hypertension artérielle, est principalement l'artériosclérose. Cette maladie dégénératrice des vaisseaux est caractérisée par l'épaississement et l'induration des tuniques de petites artères et des fins vaisseaux, causant une diminution de leur calibre et leur élasticité. L'athérosclérose est une modalité de l'artériosclérose: ici, les gros troncs artériels s'encrassent avec des dépôts graisseux jaunâtres appelés athéromes. Les principaux facteurs de risques dans la genèse de l'artériosclérose interviennent à différents niveaux de la paroi vasculaire par leurs effets mécaniques (hypertension), chimique (cholestérol) et toxique (nicotine). D'autres facteurs de risques bien définis sont le tabagisme, le diabète, l'alcool et l'embonpoint. Depuis quelques années, certains chercheurs pensent que *C. pneumoniae* pourrait s'allier à ces différents facteurs pour causer des lésions au niveau des artères. Des évidences sérologiques indiquaient une association entre les maladies coronariennes et la présence d'anticorps ou des complexes immuns spécifiques à *C. pneumoniae* (Saikku et coll; 1988; 1992 ; Thom et coll 1991; 1992). Plus récemment, l'évidence morphologique microbiologique de la présence de *C. pneumoniae* dans les plaques d'athéromes a été obtenue par la microscopie électronique, par immunocytochimie (ICC) et par PCR (Kuo et coll., 1993; Muhlstein et coll., 1996; Blasi et coll., 1996). Ces observations ne confirment pas le rôle étiologique que pourrait jouer *C. pneumoniae* dans l'athérosclérose. S'il ne s'agit pas d'une simple infection opportuniste, le rôle le plus important qu'on propose à *C. pneumoniae* lui donne une responsabilité dans l'induction des lésions initiales au niveau des artères ou d'une réaction inflammatoire qui



entraînerait l'épaississement de la paroi artérielle. Ce rôle sera confirmé à la suite de plusieurs recherches qui nécessitent préalablement une méthode de détection efficace de cette bactérie. Or présentement, les méthodes disponibles sont encore limitées. La culture cellulaire est la méthode de détection de référence, mais, elle exige des organismes viables. Elle n'est pas appropriée pour le sang. On estime seulement que la culture de *C. pneumoniae* a une sensibilité de 50 à 80 % pour la pneumonie et une spécificité de 100%. La détection d'antigènes à l'aide d'anticorps monoclonaux conjugués à la fluoresceine est la méthode qui a été la plus utilisée dans les biopsies d'athéromes. La méthode EIA existe également mais elle est surtout utilisée pour *C. trachomatis* et exige un nombre important de bactéries. Les méthodes de détection d'anticorps sont limitées, car elles ne permettent pas de distinguer les espèces de Chlamydiae, ni différencier une infection actuelle d'une ancienne infection. De plus, la méthode choisie devra être capable de détecter un petit nombre de bactéries dans des spécimen difficiles à extraire comme le sang, de par leur teneur protéique élevée, ou, comme les sécrétions respiratoires, par la multitude de micro-organismes présents dans les sécrétions respiratoires. La méthode la plus sensible actuellement est l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN à l'aide de la méthode de la PCR.

On s'appuiera sur deux approches: le développement de deux PCRs, chacun servant de contrôle à l'autre pour écarter la possibilité des faux positifs et la production par clonage des cibles moléculaires modifiées qui seront employées comme témoins positifs afin d'identifier les spécimen avec inhibiteurs de PCR qui pourront donner naissance à des faux négatifs. Les différentes paires d'amorces seront testées afin de choisir les plus sensibles et spécifiques pour cette espèce. Les marqueurs utilisés sont: le gène ribosomal 16S, spécifique et caractéristique à *C. pneumoniae*, versus le petit gène inconnu décrit par Campbell (1992) qui a beaucoup été utilisé par plusieurs chercheurs. Le gène *ppme*<sup>+</sup> de *C.*

*pneumoniae* sera également utilisé pour différencier *C. pneumoniae* de *C. trachomatis*, *C. psittaci* et *C. pecorum*.

## 1. HISTORIQUE ET CARACTÉRISATION

Les chlamydiae sont des micro-organismes qui, récemment, ont été classés parmi les bactéries. Elles ont été désignées tour à tour sous les noms de *Bedsonia*, *Myagawanella*, *Neorickettsias*. Les chlamydiae sont des bactéries gram(-), parasites intracellulaires obligatoires des cellules eucaryotes. Elles sont considérées comme des bactéries à cause de la composition de leur membrane cellulaire similaire à celle des bactéries gram(-) et leur cycle de croissance en division par fission binaire et leur cycle de vie biphasique. Le rôle pathogène de ces bactéries est depuis longtemps reconnu dans le trachome. En 1906 Halberstaedter et von Prowazek découvrent des inclusions dans les frottis conjonctivaux de trachomateux. En 1907 ils décrivent l'agent du trachome comme étant un parasite qui forme des inclusions cytoplasmiques ceci chez des orangs-outans infectés expérimentalement. Quelques années plus tard, Staargardt et Lindner trouvent des inclusions similaires dans des cellules conjonctivales des bébés atteints d'ophtalmie non gonococcique et dans des sécrétions urétrales d'hommes avec urétrite non gonococcique. Fritsch et collaborateurs, en 1910 ont pu constater la relation existant entre les infections génitales et oculaires. Récemment des placentites chez des humains ont été attribuées à des infections avec la souche ovine de *C.psittaci* (Wong et coll., 1985). Pendant les années trente et quarante, Thygeson et Stone (1942) ont fait d'autres observations sur la pathologie et la transmission des infections génitales des Chlamydiae, mais ce n'est qu'en 1957 que Tang et ses collaborateurs ont réussi à isoler *C. trachomatis* dans un sac embryonnaire de l'oeuf. Deux années plus tard, Jones et ses collaborateurs (1959) ont été les premiers à isoler *C. trachomatis* du cervix d'une mère et des yeux de son enfant qui avait des signes de conjonctivite.

Les observations faites au début du siècle peuvent être confirmées actuellement par de nombreuses études telles que celles réalisées par Jones en 1964; Dunlop et collaborateurs en 1964 ; Holt et collaborateurs en 1967 qui ont pu isoler *C. trachomatis* dans les yeux d'un nouveau né, des adultes atteints de conjonctivite et des femmes ayant des infections génitales non gonococciques. La transmission des infections entre partenaires sexuels, de la mère à son enfant et des tractus génitaux aux yeux des adultes a aussi été démontrée. Cependant il aura fallu attendre les années 70 pour que le rôle important de *C trachomatis* dans l'étiologie des urétrites non gonococciques (NGU) chez les hommes (Holmes et coll., 1975) et des cervites chez les femmes (Hilton et coll ., 1974 ; Oriel et coll ., 1978.) soit solidement établi et accepté comme une réalité clinique. Au début de l'histoire de la chlamydologie, il a été démontré que le lymphogranulome vénérien (LGV) est une infection causée par *C trachomatis*. Dans les années soixante-dix, il a été établi que plusieurs complications des infections génitales telles que les salpingites (Mardh et coll., 1977) et épididymites (Harnisch et coll., 1977) sont causées par *C. trachomatis*. Aujourd'hui *C. trachomatis* est reconnu comme étant le plus important agent des maladies transmises sexuellement. Dans la plupart des pays industrialisés, *C. trachomatis* est devenue la première cause d'infertilité et de grossesse ectopique (Bowie et Jones, 1981; Paperny et coll., 1981 ; Paavonen et al ., 1982; Kristensen et coll., 1985; Mardh, 1986; Person ,1986); ceci a été aussi établi dans les pays en voie de développement, eg. en Afrique centrale (Frost et coll ., 1987).

L'espèce *C. pneumoniae* a été récemment reconnue comme une troisième espèce du genre *Chlamydiae*. Elle est associée à des maladies respiratoires incluant la pneumonie, la sinusite et la pharyngite (Grayston et coll., 1992). Ce groupe d'organismes était connu depuis plusieurs années sous l'appellation de souche TWAR mais est présentement désigné *C. pneumoniae* (Grayston et coll., 1989). {La désignation TWAR provient des deux premiers isolats TW-183 de Taiwan et d'un autre désigné "AR-39"(acute respiratory isolate 39)}. Le premier isolat TW-183 fut réalisé en 1965 (Kuo et coll., 1986) à Taiwan, de l'oeil d'une patiente atteinte du trachome et des enfants souffrant de la conjonctivite. En 1968 un isolat similaire, appelé IOL 207, a été obtenu d'une patiente iranienne atteinte du trachome. Ces deux isolats diffèrent de *C. trachomatis* et ressemblent à *C. psittaci* du fait que les inclusions ne se colorent pas à l'iode. En 1971, avec l'arrivée des méthodes de culture de tissus, on a pu constater que la morphologie ronde et dense des inclusions de ces organismes ressemble à celle de *Chlamydia psittaci*, mais du point de vue sérologique, la souche TWAR est différente de *C. psittaci*. Les études sérologiques suggéraient que l'organisme *C. pneumoniae* n'était pas relié aux maladies des yeux. Donc, malgré leur origine oculaire humaine, ces deux souches étaient associées à *C. psittaci*. La pathogénicité de ces organismes chez les humains n'était pas encore définie quand, en 1983, les premiers isolats respiratoires, dont AR-39 furent obtenus à Seattle. Cet isolement était accompagné par les évidences sérologiques, suggérant que TW-183 était associée à la pneumonie (Saikku et coll., 1985).

## 1.1 LA TAXONOMIE DES CHLAMYDIAE

### 1.1.1 CLASSIFICATION, HABITAT ET TRANSMISSION

Le genre Chlamydiae dans l'ordre des Chlamydiales, au sein de la famille des Chlamydiaceae, regroupe 4 espèces dont 2 précédemment décrites: *C. trachomatis* qui possède deux variantes biologiques: la première responsable du lymphogranulome (LGV), et la deuxième, responsable du trachome et des infections génitales (TRIC: Trachoma inclusion Conjunctivitis). La deuxième espèce *C. psittaci* vient d'être divisée en deux, *C. pecorum* qui regroupe les souches animales et *C. psittaci*, les souches aviaires. La quatrième espèce fut reconnue, récemment comme pouvant être associée aux maladies respiratoires, autrefois était appelée souche TWAR, est présentement désignée *C. Pneumoniae*.

L'immunotypage ou le sérotypage de *C. trachomatis* par micro-immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux, a permis à l'origine de définir 15 sérotypes ou immunotypes, parmi les souches humaines (Wang et Grayston., 1970) auquel il faut ajouter le biovar "pneumonie de souris". À ce jour, 18 sérotypes différents ont été décrits: A, B, Ba, C, D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K, L1, L2, L2a , et L3 (Wang et Grayston., 1970):

- les immunotypes A, B, Ba et C sont des agents du trachome et sont à l'origine de nombreuses cécités;
- les immunotypes D, Da E, F, G, H, I, Ia J, et K sont responsables d'infections génito-urinaires, chez les adultes ainsi que les infections respiratoires et oculaires chez le nouveau-né, elles peuvent aussi provoquer occasionnellement la pneumonie et la conjonctivite chez les adultes;

- les immunotypes L1, L2, L2a, L3 sont des agents de la lymphogranulomatose vénérienne, maladie de Nicolas Favre: maladie ganglionnaire et systémique de plus en plus rare .

L'espèce *C. psittaci* a été récemment divisée en *C. psittaci* et *C. pecorum* pour distinguer des agents qui infectent les oiseaux (*C. psittaci* ) ou les mammifères (*C. pecorum* ). Les résultats du sérotypage ne sont encore que partiels pour ces deux espèces, du fait de la virulence de certaines souches et de leur vaste distribution chez de nombreuses espèces d'oiseaux et de mammifères. Selon l'hôte d'origine et les manifestations pathologiques, il existe au moins 7 sérovars.

Enfin pour *C. pneumoniae*, Grayston et ses collaborateurs (1989) ont montré que tous les isolats de *C. pneumoniae* qu'ils avaient dans leur collection apparaissaient comme des membres d'une seule espèce. L'évidence de l'existence d'un seul sérotype de *C. pneumoniae* est basée largement sur la similarité chez les isolats des profils de protéines, du profil de l'ADN génomique digéré par les enzymes de restriction et de la réactivité des séras de patients dans le test de micro-immunofluorescence avec les antigènes de la souche TW-183 et de séquences identiques d'une portion du génome (voir plus bas). Par contre, Black et ses collaborateurs (1991) ont montré l'existence de variations antigéniques chez les isolats de *C. pneumoniae*, leurs travaux sont basés sur l'analyse par immunoblot de la réponse sérologique dans une infection à *C. pneumoniae* chez différents patients, en utilisant différents isolats de *C. pneumoniae*.

## **1.1.2 AGENT ÉTIOLOGIQUE ET CYCLE DE CROISSANCE**

### **1.1.2.1 Agent étiologique**

Les chlamydiae sont des parasites intracellulaires obligatoires. Elles se multiplient uniquement à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte, formant des inclusions intracellulaires caractéristiques. Elles se distinguent des virus par leur contenu en ADN et en ARN, par les structures des parois cellulaires semblables à celles des autres bactéries gram négatifs mais sans peptidoglycans et à leurs sensibilités à une variété d'antibiotiques.

### **1.1.2.2 Le cycle de reproduction**

Après s'être liés aux récepteurs spécifiques à la surface des cellules hôtes, les corps élémentaires (CEs), pénètrent dans la cellule hôte par un mécanisme similaire à l'endocytose médiée par des récepteurs pour se retrouver dans une vacuole. Dès que le corps élémentaire pénètre dans la cellule, il se réorganise en une particule réticulée (CRs), qui est plus grosse (0.5 à 1.0  $\mu\text{m}$ ), moins dense et plus riche en ARN. Cette forme métaboliquement active, se divise par fission binaire comme les bactéries. Environ 18 à 24 heures après l'infection, les CRs redeviennent CEs par un processus de réorganisation et de condensation encore mal compris. Les CEs sont alors relargués suite à la lyse cellulaire pour initier un autre cycle d'infection. Les CEs sont spécialement adaptés pour la survie extracellulaire.



## 2. LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DE LA MEMBRANE EXTERNE

Les antigènes les mieux connus des Chlamydiae sont ceux de la membrane externe. Ils sont les cibles de méthodes de détections antigéniques et sérologiques ainsi que des méthodes moléculaires. Ces gènes qui codent pour les protéines de membrane servent également de cibles pour la PCR. Leur rôle dans la pathogénicité est souvent évoquée.

La structure antigénique des chlamydiae est complexe, avec des spécificités de genre, d'espèces, de sous-espèces et de type. On dénombre au moins 3 antigènes de genre, 2 d'espèce, au moins 2 de sous espèce et 16 de type pour *C. trachomatis*, au minimum, 6 de type pour *C. psittaci*.

Un antigène spécifique du genre est présent chez les quatre espèces de Chlamydiae. Il s'agit d'un lipopolysaccharide (LPS) qui a été localisé essentiellement au niveau du feuillet interne de la membrane externe des CEs et des CRs. Les antigènes spécifiques d'espèces qui différencient *C. trachomatis*, de *C. psittaci*, de *C. pecorum*, et de *C. pneumoniae* sont des protéines thermosensibles. Caldwell et collaborateurs (1975) ont identifié au moins 18 déterminants antigéniques spécifiques d'espèces situés sur des protéines qui sont généralement associées avec la membrane externe des Chlamydiae. La présence des antigènes spécifiques de l'espèce *C. pneumoniae* a été récemment démontrée soit avec des anticorps monoclonaux (MABS), soit par le test de la micro-immunofluorescence (MIF) (Kuo et coll., 1988).

## **2.1 PROTÉINE MAJEURE DE LA MEMBRANE EXTERNE (PPME): STRUCTURE ET SÉQUENCE**

La PPME est un antigène d'espèce qui permet de différencier les quatre espèces de chlamydiae. Elle constitue plus de 60% la membrane externe de tout les chlamydiae. Elle est présente pendant tout le cycle de développement et retrouvée à la fois sur les CEs et les CRs. Son poids moléculaire varie de 38 à 45 kDa. C'est une protéine qui aurait une fonction structurale quand le chlamydia est intracellulaire (Bavoil et coll., 1984) et une antigénicité spécifique d'espèce ou de sous-espèce:

- 39.5 kDa pour les sérovars A, B, C, (souches du trachome, régions endémiques );
- 38 kDa pour les sérovars D, E, F, G et I;
- 40 kDa pour les sérovars H, J, et K, moins communs;
- 42 kDa pour les sérovars L1 et L3 de la LGV;
- 38 kDa pour L2 qui pourrait être intermédiaire entre les agents TRIC et LGV (Salari et coll., 1981; Kaltenboeck et coll., 1992).

La PPME est un antigène qui comporte des épitopes de spécificité diverses, ce qui a permis, avec la MIF, de séparer en trois sous groupes distincts, les sérovars de *C. trachomatis*, (Wang et coll., 1985). Le premier sérogroupe nommé sérogroupe B comprend les sérovars B, Ba, D, Da, E, L1, L2 et L2a, le deuxième sérogroupe nommé sérogroupe C comprend les sérovars A, C, H, I, Ia, et J, et enfin le troisième sérogroupe nommé sérogroupe intermédiaire comprend les sérovars F, G, K, et L3. Récemment les travaux de Pool et Lamont (1992) ont permis, grâce au séquençage du domaine variable 4 du gène de la ppme<sup>+</sup> de plusieurs isolats, d'identifier 3 nouveaux variants de *C trachomatis* nommés D+, G- et J'.

Frost et collaborateurs (1995) ont été distingués par digestion de *ppme*<sup>+</sup>, avec des enzymes de restrictions, les isolats urogénitaux (qu'ils appellent Bb et Ca ) des isolats trachomateux de sérovars Ba et C.

## 2. 2. GÉNÉTIQUE DU GENE *ppme*<sup>+</sup> (protéine majeure de la membrane externe)

Les études moléculaires sur les antigènes reconnus au cours de l'infection à Chlamydiae ont permis l'isolement et la caractérisation des gènes codants pour la protéine principale de la membrane externe (PPME ou MOMP) de la plupart des sérovars de *C. trachomatis* (Stephens et coll., 1986; Stephens et coll., 1987; Pickett et coll., 1988), de quatre souches de *C. psittaci* (Zhang et coll., 1989; Herring et coll., 1989) et en 1991 celui de *C. pneumoniae* (Carter et., 1990; Melgoza et coll., 1991).

La comparaison des fragments d'ADN générés par les enzymes de restriction sur le gène *ppme*<sup>+</sup> de plusieurs isolats de *C. pneumoniae*, de *C. psittaci* et de *C. trachomatis* montre que les isolats de *C. pneumoniae* sont les mêmes alors qu'elles diffèrent de ceux de *C. psittaci* et *C. trachomatis*. Les isolats de *C. pneumoniae* ont tous 94% à 100% d'ADN du gène *ppme*<sup>+</sup> homologue entre eux, mais moins de 5% d'ADN homologue avec les isolats de *C. trachomatis* et 10% avec *C. psittaci* (Cox et coll., 1988 ). Le gène *ompA* encodant la PPME présente à peu près 70% d'identité entre *C. psittaci*, *C. trachomatis* et *C. pneumoniae*. Les études réalisées (Kaltenboeck et coll., 1993) sur la structure et la diversité allélique du gène *ompA* des quatre espèces de Chlamydiae démontrent l'existence de deux grands groupes antigéniques presque homogènes:

- le groupe de Trachome qui regroupe tous les *C. Trachomatis*; et,
- le second groupe composé de trois sous-groupes majeurs: a) le sous groupe de *C. psittaci* avec les allèles MN, 6BC, A22/M, B577, LW508, FEPN, et GPIC; b) le sous groupe de la pneumonie avec *C. pneumoniae* souche AR388 avec l'allèle KOALA; c) et le sous groupe de *C. pecorum* (avec les chlamydiae des ruminants et porcines): allèles LW613, 66p130, L71 et 1710s. L'analyse du gène ompA révèle la présence de quatre domaines variables entourés de régions conservées. Pour *C. trachomatis* et *C. psittaci*, la diversité antigénique du gène *momp*<sup>+</sup> se situe dans ces domaines. La séquence d'acides aminés de la région VDIV de *C. pneumoniae* montre seulement 13,3 à 30% d'homologie avec la séquence de la région VDIV des sérovars de *C. trachomatis*, et 45,7 à 60% avec les souches de *C. psittaci* mais très peu de variation entre les différents isolats de *C. pneumoniae* ( Gaydos et coll., 1992).

Des analyses comparatives des acides aminés déduits de la séquence du gène codant pour la PPME de quatre espèces de chlamydiae montrent également que la protéine possède quatre domaines variables qui sont espacés de cinq régions hautement conservées. Le gène *ppme*<sup>+</sup> chez les quatre espèces de chlamydiae possède une séquence signal très conservée et un site de coupure classique des protéases Leu.Gln.Ala.

### 3. ÉPIDÉMIOLOGIE

Plus de 600 millions d'hommes, de femmes et d'enfants sont touchés dans le monde par des infections causées par les chlamydiae. *C. trachomatis* cause les plus fréquentes MTS (maladies transmissibles sexuellement) dans le monde.

Au Canada, en 1989, on estimait la fréquence annuelle à 100,000 cas: hommes, femmes et enfants sont atteints. Beaucoup d'informations sur l'épidémiologie de l'infection à *C. pneumoniae* dérivent des études sérologiques avec des tests spécifiques de la MIF de *C. pneumoniae*. Ces études montrent que *C. pneumoniae* cause beaucoup d'infections dans le monde avec une séroprévalence supérieure à 50% chez les adultes (Wang et coll., 1990). *C. pneumoniae* fut reconnue pour la première fois en 1983, comme pouvant être associée aux maladies respiratoires. Certains auteurs aujourd'hui, soupçonnent que cette bactérie peut jouer un rôle dans la genèse des maladies cardio-vasculaires. Aussi Chez les animaux *C. psittaci* et *C. pecorum* sont capables de provoquer plusieurs infections comme la pneumonie, les entérites, les avortements, les infections urogénitales, la conjonctivite, les encéphalites et les polyarthrites.

#### 4. MANIFESTATIONS CLINIQUES

Les chlamydioses humains sont des infections très fréquentes, longtemps méconnues. Elles sont dues à *C. trachomatis*. Chez la femme, on rencontre la cervicite purulente qui est le point de départ fréquent des salpingites, l'urétrite et le syndrome urétral, certaines formes de pyélonéphrites, rectites, lésions génitales, et périhépatite sont rares. Chez le nouveau né, la conjonctivite et la pneumonie sont les principales manifestations de *C. trachomatis*. Certaines souches particulières sont à l'origine de la lymphogranulomatose vénérienne ou maladie de Nicolas Favre. L'augmentation de la concentration des anticorps sériques anti-chlamydiae est souvent observée chez les patients ayant des infections du tractus génital, telle qu'une maladie inflammatoire pelvienne.

Par contre lorsque l'infection se développe à la surface des muqueuses, comme par exemple dans le cas d'une urétrite à Chlamydiae qui n'induit généralement pas une réponse humorale anti-Chlamydiae. Des résultats récents ont montré que des patients ayant des maladies inflammatoires pelviennes chez lesquels on a isolé *C. trachomatis* et ceux chez lesquels on n'a pas pu isoler *C. trachomatis* du tractus génital supérieur pouvaient être distingués par la présence ou l'absence d'une réponse IgA sérique spécifique à *C. trachomatis* (Miettinen, 1990). Le risque d'infertilité chez la femme après une salpingite à Chlamydiae est mal compris. Cependant il y a une très bonne corrélation entre l'infertilité tubulaire et la présence des anticorps contre *C. trachomatis*. Soixante quatre à quatre vingt pour cent des femmes infertiles, avec une occlusion tubulaire, ont des anticorps contre *C. trachomatis*, avec une prévalence de 2 à 8 fois supérieure à celle retrouvée chez des femmes avec d'autres causes d'infertilité (Brunham et coll., 1985).

*C. pneumoniae* possède plusieurs caractéristiques épidémiologiques et microbiologiques qui suggèrent qu'elle peut jouer un rôle dans la genèse de plusieurs maladies cardio-vasculaires suite à l'association observée par plusieurs auteurs entre des titres très élevés d'anticorps anti-*C. pneumoniae* et des maladies coronariennes chroniques, et à des cas d'infarctus aiguë du myocarde (Saikku et coll., 1988; Saikku et coll., 1992; Koskenvuo et coll., 1989; Thom et coll., 1991). La pneumonie et la bronchite sont les maladies les plus fréquemment associées à *C. pneumoniae*: 10% des cas de pneumonie et approximativement 5% des cas de bronchites et sinusites chez les adultes sont attribués à cet organisme. Les personnes souffrantes des maladies respiratoires associées à *C. pneumoniae* sont plus susceptibles de développer l'asthme bronchique, suggérant que TWAR peut être un facteur dans le développement de l'asthme (Hahn et coll., 1991).

*C. pneumoniae* est impliquée dans le syndrome de Reiter. D'autres études réalisées en Finlande indiquent un risque relatif plus élevé de crises cardiaques chez les sujets atteints des maladies cardiaques chroniques et chez lesquels on note la présence des complexes immuns et des anticorps contre *C. pneumoniae*. L'évidence morphologique et microbiologique de la présence de *C. pneumoniae* dans les plaques d'athéromes a été obtenue par la microscopie électronique (Kuo et coll., 1993), par immunocytochimie et par un test à la PCR, dans les athéromes coronaires, carotides et aortiques. Les travaux de Saikku et ses collaborateurs ont démontré la présence des complexes immuns associés aux lipopolysaccharides de *C. pneumoniae* chez 57% des patients ayant un infarctus aiguë du myocarde et chez 50% des patients ayant des maladies coronariennes chroniques. Toutes ces études suggèrent que *C. pneumoniae* peut être un facteur dans l'athérosclérose. Le groupe de Muhlestein et collaborateurs en 1996 a essayé d'étudier et comprendre l'association entre *C. pneumoniae* et l'athérosclérose en comparant l'incidence de la présence de ce pathogène dans les plaques athérosclérotiques des patients qui ont subi l'athérectomie coronarienne avec une variété de patients souffrant d'autres maladies cardiaques et des personnes non malades. Ils ont remarqué une association entre l'athérosclérose coronarienne et la présence de *C. pneumoniae*; association démontrée par les forts titres sérologiques et la détection de cette bactérie dans les tissus athérosclérotiques. Dans 21 % des cas, il n'y avait pas de *C. pneumoniae* dans les artères coronariennes, ceci suggère que la présence de *C. pneumoniae* n'est pas essentiel et que d'autres facteurs peuvent jouer le même rôle dans l'athérosclérose. L'absence de *C. pneumoniae* dans des tissus contrôles de Muhlestein (1996) (des biopsies de tissus cardiaques subissant un rejet immunologique) augmente donc la probabilité que *C. pneumoniae* joue un rôle actif dans la pathogénèse naturelle de l'athérosclérose. La forte présence de *C. pneumoniae* seulement dans les artères coronaires athérosclérotiques des

malades suggère également un rôle étiologique de *C. pneumoniae* dans le développement de l'athérosclérose. Toutes ces observations ne confirment pas le rôle étiologique que pourrait jouer cette bactérie dans la genèse de l'athérosclérose. S'il ne s'agit pas d'une simple infection opportuniste, le rôle le plus important qu'on propose à *C. pneumoniae* lui donne une responsabilité dans l'induction des lésions initiales au niveau des artères ou d'une réaction inflammatoire qui entraînerait l'épaississement de la paroi artérielle. Ce rôle qui pourra être confirmé à la suite de plusieurs recherches qui nécessitent la détection efficace de cette bactérie. Or présentement les méthodes disponibles sont encore limitées.

## 5. MÉTHODES DE DÉTECTION

L'absence d'épreuves simples, peu coûteuses et fiables pour le diagnostic des infections à chlamydiae a jusqu'à maintenant limité les efforts. Ceci est dû à la biologie de ces bactéries qui les rend difficiles à mettre en évidence, car les chlamydiae sont des parasites obligatoires intracellulaires. On peut classer les recherches basées sur leurs prélèvements et diagnostics biologiques en quatre groupes:

1. la culture est la technique la plus sûre, mais très délicate à cause de la fragilité des Chlamydiae;
2. la recherche directe des particules de chlamydiae dans les prélèvements par détection de molécules d'ARN ribosomal ou à l'aide d'anticorps monoclonaux soit par l'immunofluorescence, soit par la méthode ELISA. Lorsqu'il n'y a que quelques particules



chlamydiennes dans un spécimen, l'examen microscopique est sujette à des erreurs d'interprétations, tandis que l'ELISA et la recherche d'ARNr sont peu sensibles;

3. la méthode de détection d'ADN par la PCR;
4. la sérologie par les anticorps de chlamydiae n'est utile que dans certains cas.

Comme méthode sérologique, quatre tests standardisés sont disponibles pour le diagnostic des infections à chlamydiae: la fixation du complément (FC), la micro-immunofluorescence (MIF), la fluorescence des inclusions, et la méthode d'ELISA. La sensibilité, la spécificité et la valeur prédictive positive ou négative de toutes ses méthodes sont encore mal déterminées et par conséquent limitées, pour distinguer une infection actuelle versus une ancienne infection et pour différencier les quatre espèces de chlamydiae.

La méthode clairement reconnue comme étant la plus sensible pour *C. trachomatis* est l'amplification à l'aide la polymérase, soit la méthode appelée PCR ( Quinn, 1994). Cette méthode permet d'amplifier et d'obtenir plusieurs copies d'une molécule choisie d'ADN, c'est une méthode qui est également appropriée et utilisable pour le sang. Pour ces raisons, la méthode de la PCR fournit un outil de choix pour étudier des séquences cibles à partir d'une quantité minimale d'ADN génomique. La PCR, dès son apparition en 1987, a été considérée comme un outil diagnostique prometteur à cause de sa sensibilité élevée et de sa spécificité. *C. trachomatis* était d'abord un modèle privilégié pour valider la PCR en tant qu'un test clinique pouvant remplacer la culture et l'ELISA. Deux cibles étaient préférentiellement étudiées avec différentes paires d'amorces: le gène *ppme*<sup>+</sup> est un plasmide présent à plusieurs copies dans la bactérie. Présentement, une trousse utilisée en laboratoire clinique pour détecter *C. trachomatis* est commercialisée par la compagnie «Roche Diagnostic Systems.». Il a été plus facile à développer un test dans le cas de *C. trachomatis* car elle possède en plus

de son ADN chromosomique, un plasmide cryptique d'une taille d'environ 7500 paires de bases qui est commun à tous les sérotypes du *C. trachomatis* alors que *C. pneumoniae* ne possède pas de plasmide. D'autres cibles ont été explorées pour *C. pneumoniae*. Pour le gène *ppme*<sup>+</sup>, il est nécessaire d'utiliser une PCR nichée pour augmenter la sensibilité du test. Le gène de Campbell, dont le rôle est inconnu, mais qui est présent dans tous les isolats de *C. pneumoniae* a été utilisé également en PCR nichée pour augmenter la sensibilité (Campbell et coll., 1992). Le gène d'ADNr spécifique à *C. pneumoniae* peut, par contre, être détecté même avec une seule PCR (Gaydos et coll 1992).

## 6. PROJET

Notre objectif est de développer un test diagnostique pour *C. pneumoniae*. La méthode choisie devra être capable de détecter un petit nombre de bactéries dans les spécimens difficiles à extraire à cause d'une teneur protéique élevée (le sang) ou la multitude de micro-organismes présents dans les sécrétions respiratoires. L'absence d'un étalon de quantification, de sensibilité ou un contrôle positif utilisé pour identifier les spécimens avec inhibiteurs à PCR, complique également le processus. Les limites de ces méthodes de détections nous obligent à mettre au point des réactifs de diagnostics précis basés sur l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN par la PCR.

On s'est appuyé sur deux approches pour atteindre une sensibilité optimale et une spécificité maximale de la méthode PCR: 1) le développement de deux PCRs. 2) la production par

clonage de deux contrôles positifs qui nous serviront d'étalon de quantification et de sensibilité. Les marqueurs utilisés ont été choisis en fonction de nos différentes cibles: le gène ribosomal 16S de *C. pneumoniae* qui est un gène bien caractérisé, versus le petit gène inconnu décrit par Campbell qui a été utilisé par plusieurs chercheurs. Le gène *ppme*<sup>+</sup> de *C. pneumoniae* servira à déterminer ou à identifier l'organisme détecté. On choisira parmi trois méthodes d'extraction (NaOH 80°C, NaOH 95°C et la Protéinase-K- lysis) celle qui nous permettra d'extraire de façon optimale l'ADN des échantillons bactériens. Les différentes conditions de PCR (la concentration des dNTPs et de MgCl<sub>2</sub> dans la réaction) seront testées pour une amplification optimale, ainsi que les différentes paires d'amorces, afin de choisir les plus sensibles et spécifiques à *C. pneumoniae*.

## **7. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **7.1 AMPLIFICATION DE L'ADN PAR LA MÉTHODE DE LA "PCR" (*Réaction de la Polymérisation en Chaîne*)**

#### **7.1.1 GÉNÉRALITÉS**

La PCR ou réaction de la polymérisation en chaîne, est une technique d'amplification qui nécessite le choix de deux (2) oligonucléotides ou amorces de part et d'autres de la région à amplifier. C'est une méthode qui se fait en trois étapes:

- La première étape est la dénaturation de l'ADN avec la chaleur (94°C);
- Ensuite, l'hybridation des deux amorces sur l'ADN cible;

- La troisième étape est l'extension des deux amorces par l'ADN polymérase qui vont s'allonger dans le sens 5'→3', en utilisant les désoxynucléotides triphosphates (dNTP) en excès dans le mélange réactionnel, créant ainsi une séquence complémentaire d'ADN.

Ces étapes vont doubler la quantité d'ADN présent à la fin du cycle précédent. Puisque l'amplification est exponentielle il en résulte une réplique préférentielle de l'ADN situé entre les deux sites d'amorçages, jusqu'à ce qu'il constitue, après 30 à 40 cycles, pratiquement 100% de la masse de l'ADN.

Pour réaliser ce projet, deux programmes ont été employés principalement pour l'amplification. Le premier comporte 41 cycles (programme 40.1.1.2) dont les premiers 40 cycles comprennent une dénaturation d'une minute à 94°C, une minute à 55°C pour l'hybridation des 2 amorces sur l'ADN et deux minutes à 72°C pour l'élongation.

Le dernier cycle comprend une élongation à 72°C de 8 minutes pour bien finaliser la polymérisation, le programme prend fin à 4°C. Le deuxième programme utilisé comporte moins de cycles et se nomme 30.1.1.2. Il se déroule exactement comme le premier, mais avec 31 cycles au lieu de 41.

L'extrait d'ADN sera dilué et utilisé dans la réaction de la PCR dans un volume final de 50µl contenant le tampon "hot tub" ou tampon tub chaud (10 mM de tris HCl PH8, 50mM de KCl, 2.5mM ou 1.5mM de MgCl<sub>2</sub> et 0,001% (P/V) de gélatine), 200µM de chaque nucléotide, une unité de la Taq polymérase (Perkin-Elmer Cetus, Newark, CT) et une paire des amorces citée au paragraphe 7.1.3, à une concentration finale de 1µM.

## **7.1.2 MÉTHODES D'EXTRACTIONS D'ADN**

### **7.1.2.1 Méthodes NaOH 80°C et 95°C**

Le spécimen (50µl) est mélangé avec 50µl de NaOH 2mM et est centrifugé pendant 5 minutes. Le culot est resuspendu dans 10µl du NaOH 1mM. Le spécimen est chauffé à 80°C pour la méthode NaOH 80°, ou 95 °C pour la méthode NaOH 95°C, pendant 10 minutes et ensuite refroidi dans la glace. Différentes dilutions sont faites pour l'amplification au PCR.

### **7.1.2.2 Méthode LYSE -PROTÉINASE -K**

Le spécimen (10µl) est mélangé avec 10µl du tampon de lyse, après une centrifugation à 13000 rpm pendant cinq minutes, le culot est resuspendu dans un mélange contenant 5µl de tampon, 0,5µl de PK (protéinase K) 1 mg /ml, 0,5µl de Tween 20 (5%), 0,5µl de NP40 (5%), pour un total de 6,5µl. Lorsque le culot paraît visuellement contenir plus de 10<sup>5</sup> cellules, 25 µl du mélange sont utilisés pour le resuspendre. L'extrait est chauffé 1 heure à 56°C et ensuite 10 minutes à 95°C. Le spécimen est clarifié en centrifugeant cinq minutes à 13000 rpm le surnageant et conservé dans la glace

## **7.1.3 LES AMORCES**

Les amorces utilisées ont été synthétisées dans le laboratoire du Docteur Bourgaux selon la méthode de Shulholf et coll (1987). Les séquences des amorces utilisées sont données ci-

dessous. Les amorces ont été choisies en fonction de nos différentes cibles: le gène de la PPME (CT11., CT12., CT5B., CT3B et CT8B) de *C. pneumoniae* (Melgosa et coll., 1991) de *C. trachomatis* (Stephens et coll., 1986), le petit gène inconnu décrit par Campbell (Campbell et coll., 1992) (CpHRL1., CpHLR1 et CpHM1), et le gène de l'ARN ribosomal 16S de *C. pneumoniae*. (Gaydos et coll., 1992) (CpnA., CpnB et CT1151R).

- CT11 GCATTTA(C/T)GTGAGC(A/T)GCTCT. "20 mère".
- CT12 GGAGATCCTTGCGATCCTTG. "20 mère".
- CT5B AGCTTTTCTAGATTTAAACTTG. "20 mère".
- CT3B GGGAACCCTTCTGA(A/T)CCAAG. "20 mère".
- CT8B GAACTGACCA(G/T)(A/T)TACGTGAG. "20 mère".
- CpHRL1 GTTGTTTCATGAAGGCCTACT. "20 mère".
- CpHLR1 TGCATAACCTACGGTGTGTT. "20 mère".
- CpHM1 GTGTCATTGCGCCAAGGTAA. "20 mère".
- CpnA TGACAACTGTAGAAATACAGC. "21 mère".
- CpnB CGCCTCTCCCTATAAAT. "18 mère".
- CT1151R GATACGTGAGC(A/T)GCTCTCTC. "20 mère".

## **7.2 DIGESTION ET ÉLECTROPHORÈSE D'ADN**

L'électrophorèse sur gel d'agarose, sur gel de polyacrylamide (SDS) et gel de séquençage sont des façons qui permettent de vérifier l'identité d'un gène amplifié par PCR, de confirmer l'identité d'un clone après une digestion enzymatique. Le séquençage fournit souvent une preuve supplémentaire irréfutable.

### **7.2.1 DIGESTION D'ADN AUX ENZYMES DE RESTRICTION**

Dans notre projet les enzymes utilisés fonctionnaient soit à 60°C ou le plus souvent à 37°C pendant une à deux heures, le traitement se fait dans un volume de 10µl contenant 1µl de tampon 10x (New England Biolab., Pharmacia., Boehringer), 0.1µl de BSA 0.5mg/ml (pour certains enzymes), 1µl de la RNase, 6.5µl d'eau et 1µl d'ADN en provenance de la PCR ou extrait de plasmide bactérien.

### **7.2.2 ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE**

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% ou 2% (selon la taille du fragment à visualiser), dans un tampon TAE concentré une fois (40 mM tris HCl, 5mM d'acide acétique, 1mM EDTA ) à l'aide d'appareils verticaux (14 x 18 x 0.3 cm) ou horizontaux (7.5 x 5 cm) dans des conditions variant de 5 volts par cm à 15 volts par cm. Les gels sont colorés par immersion dans une solution de bromure d'éthidium (EtBr) à 2 µg/ml pendant environ 15 minutes. La visualisation et la photographie se font sous lumière U.V (254 nm) .

### **7.2.3 ÉLECTROPHORÈSE D'ADN SUR GEL ACRYLAMIDE**

Les petits fragments d'ADN (plus petit que 300 paires de bases) sont séparés sur des gels de 10 % ou 12 % polyacrylamide, d'épaisseur 1.5mM dans un tampon tris borate (Frost et coll., 1991). Le gel est fixé dans une solution de 10 % d'éthanol, 0.5 % d'acide acétique.

La coloration à l'argent se fait pendant 2 heures dans une solution de nitrate d'argent 11 mM. Enfin la réduction dans une solution contenant du NaOH 0.75 M, 0.1 M de formaldéhyde, 0.0023 M de borohydrure de sodium jusqu'à l'apparition des bandes. La visualisation et la prise de photos se font sous lumière blanche.

#### **7.2.4 DIGESTION D'ADN À LA NUCLÉASE "MUNG BEAN"**

La nucléase "Mung bean" (MBN) est un enzyme utilisé pour éliminer les molécules d'ADN à simples brins pour obtenir des bouts francs. Cette digestion se fait dans un volume final de 30 µl contenant l'ADN d'un plasmide, 3µl de tampon MBN 10x et 1µl de la MBN (New England Biolab). L'incubation se fait pendant 30 minutes à 37°C. L'enzyme est inactivé par extraction au phénol:chloroforme suivie par une précipitation de l'ADN à l'alcool (120µl) et 4µl de NaAc 3M. Après 30 minutes à -20°C on centrifuge pendant 15 minutes et le culot est resuspendu dans du TE (10mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA )

### **7.3 PURIFICATION DE L'ADN**

#### **7.3.1 MÉTHODE "HIGH PURE PCR PRODUCT PURIFICATION" ou méthode de la haute purification des produits de la PCR**

Cette méthode qui nécessite plusieurs centrifugations, utilise une trousse commercialisée par Boehringer Mannheim (Laval, Canada). Le principe de la méthode est basé sur la liaison des acides nucléiques avec les fibres de verre ou de la silice en présence d'un sel chaotrope concentré. La réaction de liaison détruit la structure organisée des molécules d'eau et leur



interaction avec les acides nucléiques. À 500µl de tampon de liaison qui contient des particules de silice, on ajoute 100µl de l'échantillon de la PCR. Après une centrifugation de 30 secondes qui sédimente les particules de silice avec l'ADN adsorbé, on lave en centrifugeant avec 50µl de tampon de lavage (20mM NaCl et 2mM de tris-HCl, pH 7.5, 25° C) et on récupère l'ADN purifié avec 50µl à 100µl de tampon d'élution (10mM de tris-HCl et 100mM d'EDTA, pH 8.5, 25 °C).

### 7.3.2 MÉTHODE “FREEZE AND SQUEEZE” ou méthode de la pression et de la congélation

La méthode “freeze et squeeze” est une méthode de préparation et de l'isolement de l'ADN à partir d'un gel d'agarose. La tranche de gel qui correspond à la bande désirée est découpée avec un scalpel sous la lumière UV (305 nm), puis introduit dans un volume égal (350µl) de 1 mM EDTA et 10mM Tris à pH 8 (T.E). Le tube est mis au congélateur à -70°C, pendant une heure, et décongelé afin de dénaturer la structure de l'agarose et laisser éluer l'ADN. L'agarose et les contaminants sont éliminés par centrifugation après extraction avec un volume égal de phénol. La précipitation à l'alcool des surnageants se fait après addition d'un demi volume d'acétate d'ammonium 7.5 mM et 3 volumes d'éthanol en incubant une heure dans la glace sèche. Après une centrifugation, suivie d'un rinçage à l'alcool on jette le surnageant et on récupère l'ADN qui est resuspendu dans du T.E. (10mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA )

### **7.3.3 TECHNIQUE DE RÉCUPÉRATION DE L'ADN AVEC LA MEMBRANE DEAE NA45**

Dans cette technique on utilisera une électrophorèse horizontale pour pouvoir intercepter la bande d'ADN désirée. Elle sera d'abord localisée par coloration au bromure d'éthidium, et un petit morceau de membrane DEAE NA45 sera placé en avant de la bande. Une fois la membrane placée, la migration par électrophorèse est continuée jusqu'à ce que la totalité de la bande d'ADN soit absorbée sur la membrane. On rince la membrane à l'aide du tampon "net" (50mM Tris HCl pH 8, 0.15M NaCl, 10mM EDTA pH 8) et la membrane est immédiatement placée dans un tube à microfuge contenant d'une solution "net" très salée (50mM Tris HCl pH 8, 1M NaCl et 10mM EDTA pH 8), généralement 150 à 250 µl sont utilisés à cet effet. Le tube est incubé entre 55 et 68°C pendant 10 à 45 minutes, en agitant occasionnellement afin de détacher l'ADN de la membrane. L'ADN élué est précipité à l'alcool avec 2 volumes d'éthanol froid, pendant 20 minutes, suivie d'une centrifugation pour rincer le culot. L'ADN est dissous dans du T.E.

### **7.4 CLONAGE DE L'ADN**

Le clonage moléculaire se fait en deux étapes. Dans la première, une molécule d'ADN recombinant est produite en excisant l'ADN de façon à obtenir l'insert d'ADN. Ce dernier est joint ensuite à une molécule d'ADN appelée ADN vecteur. À la seconde étape, la molécule d'ADN recombinant (insert plus vecteur ligaturés) est introduite dans une cellule hôte compatible. À la fin, on sélectionne les cellules qui possèdent les molécules d'ADN recombinant. La sélection utilisée ici repose sur la résistance à un antibiotique.

### 7.4.1 PLASMIDES OU VECTEURS DE CLONAGE

On se sert comme vecteurs de clonage de l'ADN plasmidique, des bactériophages ou des virus eucaryotes. Dans notre projet, deux plasmides ont été utilisés principalement pour les différents clonages: le pUC-PPME pneumoniae (produit par H. Cheriti, Labo Eric Frost, Sherbrooke, Canada) et le vecteur pUC-PCR; tout deux étant des plasmides recombinants issus de clonages antérieurs.

#### 7.4.1.1 Plasmide pUC-PPME pneumoniae

Ce plasmide produit par H.Cheriti, (étudiant gradué diplômé du Dr E. Frost, résultats non publiés) est un recombinant contenant le gène *ppme*<sup>+</sup> de *C. pneumoniae* obtenu par PCR avec les amorces CT9 et CT10 ( tous deux ayant des sites KpnI) et cloné dans le vecteur pUC-19 au site KpnI. Ce recombinant est traité par l'enzyme BamHI (enzyme qui a un site au milieu du gène *ppme*<sup>+</sup> et qui devra générer un site MboI, enzyme que l'on utilisera pour la digestion de l'ADN de l'insert), de manière partielle, et donne des bouts cohésifs. Il est ensuite purifié sur gel selon la méthode de la pression et de la congélation. La quantification de l'ADN obtenu est suivie par une déphosphorylation avec la phosphatase alcaline.

#### 7.4.1.2 Plasmide pUC-AHD'2 adaptateurs appelé VECTEUR pUC-PCR

Le vecteur pUC est le plasmide qui sera utilisé pour le clonage de tout les produits amplifiés par PCR, un plasmide universel ayant deux sites AhdI créés dans le site de clonage multiple.

Les fragments porteurs de ces deux sites AhdI ont été décrits de telle manière que ce soit le nucléotide T qui soit la base non appariée en 3' laissée par la digestion par AhdI. Les produits issus d'une amplification par PCR à l'aide de la Taq polymérase, possèdent souvent un nucléotide A ajouté en 3' par la polymérase. Ainsi, il y aura appariement entre la base T en 3' du plasmide et la base A en 3' de l'insert ou le produit de la PCR. La construction de ce plasmide hybride issu d'un échange de fragment entre le vecteur *Pmal-p2* (New England Biolabs, Mississauga, Ontario) ayant perdu le site AhdI dans le gène de l'ampicilline mais qui porte deux sites AhdI créés dans son site de clonage multiple et le *Puc19* va se faire en plusieurs étapes: 1) la modification du site AhdI du gène de l'ampicilline, dans *Pmal-p2* et obtention de *Pmal-p2-Ahd*<sup>-</sup>, 2) la création de deux sites AhdI dans le site de clonage multiple de *Pmal-p2-Ahd*<sup>-</sup> et obtention de *Pmal-p2-Ahd*<sup>-2</sup> linkers et en 3) le transfert de ces modifications de *Pmal-p2* dans *Puc-19* pour l'obtention du plasmide universel de pUC-Ahd<sup>-2</sup> adaptateurs (voir chapitre 8-7)

#### 7.4.2 LIGATION

Les ADNs de l'insert et du plasmide linéarisé sont liés ensemble afin de former une molécule circulaire. Lorsque les deux ADN ont des bouts complémentaires, ils sont mélangés avec un excès de trois à dix fois de l'insert dans généralement 20µl de tampon ligase (Amersham, Oakville, Ontario) et généralement 0.5 à 5 unité de T4 DNA ligase, l'incubation est faite à 16 °C pendant 16h. Lorsque les deux ADNs ont des bouts francs 10 à 15 unités d'enzyme sont utilisés et la réaction dure 2 à 16h entre 2 à 16°C. En général le vecteur a été traité au préalable avec la phosphatase alcaline (Pharmacia, Montréal, Canada) selon les

recommandations du fournisseur afin d'empêcher le vecteur de se recirculariser sur lui même (Maniatis, 1982).

#### 7.4.3 PRÉPARATION DES BACTÉRIES COMPÉTENTES

Les bactéries compétentes *E.coli DH5 $\alpha$*  et *E.coli TB1* sont utilisées pour la transformation du produit de ligation et sont préparées d'avance. Une colonie bactérienne repiquée estensemencée dans 5 ml de milieu Luria-Bertani et incubée avec agitation à 37°C jusqu'à une densité optique (D.O) de 0.55 unités à 650 nm. La culture est alors diluée 20 fois et incubée de la même façon jusqu'à une D.O de 0.48unités. La suspension est centrifugée à 5000g pendant 5 minutes, le culot est repris dans 40ml de tampon TFB1 (acétate de potassium 30 mM, RbCl<sub>2</sub> 100mM, MnCl<sub>2</sub> 50mM, glycérol 15% v/v, pH 5.8), et gardé à 4° C pendant 5 minutes.

Après une autre centrifugation dans les même conditions, le culot est repris dans 4ml de TFB2 (MOPS 10mM, CaCl<sub>2</sub> 75mM, RbCl<sub>2</sub> 10mM, glycérol 15% v/v pH 6.5). Cette suspension est gardée sur la glace pendant 15 minutes, aliquotée et conservée à -70°C.

#### 7.4.4 TRANSFORMATION BACTÉRIENNE ET IDENTIFICATION DES PLASMIDES RECOMBINANTS

Décrite en 1983 par Hanahan, la transformation bactérienne se fait de la manière suivante: 100 µl de bactéries compétentes sont décongelées et gardées dans la glace pendant 10 minutes. Le produit de ligation à une concentration inférieure à 5ng/µl est ajouté à la

suspension bactérienne et gardé dans la glace pendant 30 minutes. Ces bactéries sont alors soumises à un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes puis remises sur la glace pendant deux minutes. Une quantité de 0.9 ml du milieu Soc (2% bactotryptone, 0.5% d'extrait de levure, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 20mM de MgCl<sub>2</sub>, 20mM de glucose) est ajoutée aux transformants et la suspension est incubée à 37°C pendant une heure pour permettre l'expression du phénotype de résistance à l'ampicilline. Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur la boîte de pétri contenant 100µg/ml d'ampicilline. Seuls les transformants ayant acquis le gène de résistance à l'ampicilline vont pousser après 18 heures d'incubation à 37°C. Les colonies sont repiquées et analysées par minipréparation. Le traitement enzymatique ou l'amplification par la PCR seront exécutés pour l'identification et la recherche des recombinants.

#### **7.4.5 MINIPRÉPARATION DES PLASMIDES**

##### **7.4.5.1 Méthode par ébullition de Holmes et Quigley (1981)**

Après repiquage de chaque colonie et incubation pendant 18 heures à 37°C avec agitation dans 5 ml de LB et l'ampicilline (100µg / ml), l'ADN plasmidique est extrait des bactéries à partir de 1.5 ml de chaque culture. D'après Holmes et Quigley (1981), 1.5ml de cette culture est prélevé et centrifugé pendant 2 minutes, on resuspend le culot dans 100 µl de tampon "stet" (8% poids/volume de sucrose, 5% volume/volume de triton, 50mM d'EDTA, pH 8, 50mM de tris-HCl PH8), et on ajoute 10 µl d'une solution fraîche de lysozyme(10mg/ml). Après incubation dans de l'eau bouillante durant 40 secondes et centrifugation, pendant 15 minutes, le surnageant est mélangé avec du phénol-chloroforme (volume égal), et centrifugé

pendant 5 minutes. Après une deuxième extraction au phénol chloroforme, on ajoute un volume égale d'isopropanol froid et on garde à -20°C pendant 10 minutes avant de centrifuger pendant 15 minutes. On jette le surnageant et le culot est rincé avec de l'éthanol. Il est resuspendu dans 10µl de T.E. Le rendement de cette méthode est de 4 à 8µg d'ADN /5ml de la culture bactérienne.

#### **7.4.5.2 Méthode décrite par C. Legoiul et Coll., (1994)**

Ces derniers ont modifié la méthode conventionnelle d'extraction d'ADN par lyse alcaline en changeant l'ordre d'ajout des solutions et en omettant la phase d'extraction au phénol; ceci pour accroître la rapidité et la simplicité de cette procédure.

Les bactéries sont centrifugées puis resuspendues dans 100 µl de solution1 (50mM de glucose, 35mM de tris 10mM d'EDTA, pH 8), 125 µl de solution 2 fraîche (0.2N de NaOH avec 1% SDS) sont ajoutés, en mélangeant par inversion. On ajoute 200 µl de chloroforme et on mélange toujours en inversant plusieurs fois. Après une minute de lyse, 150 µl de la solution 3 (3M d'acétate de potassium, 2N d'acide acétique glacial) sont ajoutés; les tubes sont inversés rapidement pendant 2 à 3 secondes et centrifugé pendant 4 minutes. La phase aqueuse est transférée dans un tube et l'ADN est précipité en ajoutant 2 volumes d'éthanol, suivi de la centrifugation à 4°C pour 4 minutes. Le culot est rincé avec de l'éthanol et on le resuspend dans du T.E.

## 7.5 L'ADN DE L'INSERT

L'ADN de l'insert peut être issu d'une amplification par PCR. Lors de cette amplification la Taq polymérase ajoute le plus souvent un adénosine (A) du côté 3' du gène amplifié et on utilise l'activité exonucléase 3'-5' de la T4 DNA polymérase pour rendre franc les bouts du gène amplifié afin de faciliter son clonage. Dans une autre stratégie un vecteur a été construit ayant, après traitement avec un enzyme de restriction, un nucléotide T en 3' qui facilite le clonage de produit de la PCR qui portent un A en 3'. La terminale transférase peut être utilisée pour ajouter les nucléotides à l'extrémité 3' de l'insert dans certain cas. L'ADN de l'insert utilisé dans notre projet est: soit un ADN B1-20 du virus *Polyome*, amplifié par la PCR avec les amorces CAT2 et ERL2, soit un ADN de *C. pneumoniae*, amplifié par les amorces CpnA et CpnB. Cet insert est purifié par plusieurs méthodes (voir section 7.3.) pour favoriser le clonage.

## 7.6 SÉQUENÇAGE

Le séquençage est fait suivant la méthode de PROMEGA (Madison, USA). Elle débute par le marquage des amorces. Pour 6 séries de réaction de séquence utilisées, on a mélangé dans un tube de 1.5ml: 1µl (10pmol= 67ng pour un 24 mère) d'amorces avec 3µl (10pmol) de gamma-ATP marqué au  $^{32}\text{P}$  ou au  $^{35}\text{S}$ , 1µl de tampon T4 kinase10x, 0.75µl de l'enzyme T4 kinase et 4.25µl d'eau. La réaction se fait à 37° C pendant 10 à 30 minutes pour le  $^{32}\text{P}$  et pendant 4h à 16° C pour le  $^{35}\text{S}$ . L'enzyme est inactivé à 90°C pendant 2 minutes. Ces amorces radioactives sont utilisées avec la trousse. Le marquage des amorces est suivi par la phase d'extension et la réaction finale. Dans chaque tube de séquence contenant (G, A, T,



C), on ajoute 2µl du mélange d/ddNTP approprié et on garde dans la glace pour la suite des manipulations. Pour chaque série de séquence on ajoute 2,6 à 26ng d'ADN de PCR, 5µl de tampon de séquence 5x et 1.5µl d'amorces marquées au  $^{32}\text{P}$ , on complète avec de l'eau stérile pour un volume finale de 20µl. On ajoute 1µl de Taq polymérase (5 unité/µl), 4µl de mélange (amorces, enzyme, tampon). On recouvre avec une goutte d'huile. L'appareil à PCR est chauffé à 95°C, pendant 2 minutes juste avant d'introduire les tubes. Le programme utilisé comporte 30 cycles dont 30 secondes de renaturation à 95°C, 30 secondes de dénaturation à 42°C et 1 minute d'extension à 70°C. 3µl de la solution d'arrêt sont ajoutés pour arrêter la réaction. On chauffe à 70°C pendant 2 minutes juste avant de déposer les échantillons sur gel de séquençage.

## 8. RÉSULTATS

Afin d'atteindre une sensibilité optimale et une spécificité maximale de la méthode PCR, on a d'abord eu besoin d'évaluer les trois méthodes d'extraction d'ADN et choisir celle qui nous permettra d'extraire de façon optimale l'ADN, ensuite on a mis au point les conditions de la PCR pour une meilleure amplification en testant les différents paramètres tels que la concentration de  $\text{MgCl}_2$  et des dNTP dans le mélange à PCR. Différentes paires d'amorces ont été également testées afin de choisir les plus sensibles et spécifiques à *C. pneumoniae*. Les marqueurs utilisés ont été choisis en fonction de nos différentes cibles: le gène ribosomal 16S de *C. pneumoniae* qui est un gène bien caractérisé, versus le petit gène inconnu décrit par Campbell qui a été utilisé par plusieurs chercheurs. Le gène *ppme*<sup>+</sup> de *C. pneumoniae* servira à déterminer ou à identifier l'organisme détecté. Afin d'identifier les spécimens avec

inhibiteurs lors de la détection de *C. pneumoniae*, il nous a fallu produire par clonage deux cibles moléculaires modifiées (pUC-PPME spécifique au gène *ppme*<sup>+</sup> de *C. pneumoniae* et pUC-ADNr spécifique au gène ribosomal 16-S) qui nous serviront non seulement de contrôles positifs mais aussi d'étalon de quantification et de sensibilité.

### **8.1 ÉVALUATION DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION D'ADN LA MIEUX ADAPTÉE**

Afin de déterminer la méthode d'extraction d'ADN la mieux adaptée, trois méthodes ont été testées sur l'ADN de la souche TWAR: méthode NaOH 80°C, méthode NaOH 95°C et la méthode lyse avec la protéinase-K. Une préparation de corps élémentaires de *C. pneumoniae* produit in vitro sur cellules en culture a été diluée dans un extrait de cellules Mc-Coy afin d'imiter un échantillon clinique. Des aliquots identiques des dilutions  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ , et  $10^{-10}$  furent extraits par les trois procédures et ensuite amplifiés par PCR avec les amorces CT3B, CT8B suivies de CT11 et CT12 (pour le gène de la *ppme*<sup>+</sup>). Le produit d'amplification a été séparé sur gel d'agarose (voir résultats à la figure 1) et l'intensité de la bande à 1000 pb fut évaluée visuellement. Sur cette figure, il s'avère que la bande d'ADN amplifiée est visible jusqu'à la dilution  $10^{-10}$  lorsque l'extraction NaOH 80°C fut employée mais seulement à des dilutions  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  lorsque NaOH 95°C ou lyse protéinase-K, respectivement, furent employées. Cette expérience fut reprise quatre fois avec l'amplification par les amorces CpnA et CpnB (pour le gène ribosomal 16S) et quatre fois également avec CT12 et CT5B (pour le gène de la *ppme*<sup>+</sup>). À chaque occasion l'extrait NaOH 80°C permettait la visualisation d'ADN après amplification à une dilution plus grande que NaOH 95°C et deux fois sur quatre à une dilution plus grande que PK-lyse. À deux occasions les

extraits NaOH 80°C et PK-lysis donnaient des résultats équivalents. On a dû choisir la méthode NaOH 80°C qui semblait nous donner des résultats constants et meilleurs par rapport aux autres méthodes. Les résultats présentés ne comportent pas de contrôles sans ADN car ceux avec contrôles sans ADN obtenus n'étaient pas présentables pour figurer dans un mémoire.

## **8.2 LA MISE AU POINT DES CONDITIONS DE LA PCR**

Afin d'optimiser l'utilisation de la PCR pour la mise au point d'une méthode de détection de *C. pneumoniae*, différents paramètres ont été testés tels que: la concentration de MgCl<sub>2</sub> dans le tampon "Hot-Tub", les différentes concentrations de dNTP dans la réaction de la PCR ainsi que la sensibilité des différentes paires d'amorces.

## **8.3 EFFET DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE MgCl<sub>2</sub> DU TAMPON "HOT-TUB"(ou tampon tub chaud) SUR LA SENSIBILITÉ DE LA PCR**

Des concentrations de MgCl<sub>2</sub> de 0.75mM, 1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM dans un volume final de 50µl ont été utilisées sur différentes paires d'amorces CpnA CpnB, CT3B CT8B, CT11 CT12, CT12 CT5B et les paires CpHR1 CpHLI, CpHR1 et CpHM1 avec de l'ADN issu d'une préparation de corps élémentaires de *C. pneumoniae* produit in vitro sur cellules en culture et diluée dans un extrait de cellules Mc-Coy afin d'imiter un échantillon clinique. L'extraction fut réalisée avec la méthode NaOH 80°C. Le produit d'amplification a été séparé sur gel d'agarose et l'intensité des bandes sur chaque paire d'amorces et sur chaque concentration de MgCl<sub>2</sub> furent évaluées. Cette expérience fut reprise trois fois et les

résultats à la figure 2A et 2B montrent toujours lors de ces trois reprises que la variation de la concentration de  $MgCl_2$  dans le tampon ne semble pas affecter la sensibilité et l'efficacité de la PCR surtout avec les paires d'amorces utilisées pour le gène ribosomal 16S CpnA et CpnB; les paires CT11 et CT12; CT12 et CT5B ainsi que CT3B et CT8B pour le gène de la PPME. Par contre la paire externe CpHR1 et CpHL1 du petit gène inconnu de Campbell fonctionne bien mieux avec une concentration de 0.75mM et la paire interne CpHR1 et CPHM1 avec une concentration de 2.5mM de  $MgCl_2$ .

#### **8.4 EFFET DE LA CONCENTRATION DES dNTPs SUR LA SENSIBILITÉ DE LA PCR**

Dans 50µl de la réaction à PCR, on utilise en général, une concentration de 200µM de dNTP, ici les concentrations des dNTPs de 100µM, 200µM, 300µM, 400µM. sont testées sur l'ADN issu d'une préparation de corps élémentaires de *C. pneumoniae* produit in vitro sur cellules en culture et diluée dans un extrait de cellules Mc-Coy afin d'imiter un échantillon clinique. L'extraction fut réalisée avec la méthode NaOH 80°C et amplifiée par PCR avec les paires d'amorces CT3B -CT8B pour la PCR externe suivi de la paire CT12-CT5B pour l'interne, CT3b -CT8b pour la PCR externe suivi de la paire CT12-CT11 pour l'interne, CpHR1 et CpHL1 pour le premier PCR, suivie de la deuxième paire CpHR1 et CPHM1 et avec la paire d'amorce CpnB et CpnA. Les résultats (à la figure 3) de cette expérience, visualisés sur gel d'agarose, montrent que la variation de la concentration des dNTPs ne modifie pas l'efficacité de l'amplification de l'ADN par PCR puisque l'intensité des bandes des différentes concentrations des dNTPs ne changent pas chez toutes les paires d'amorces. La concentration de 200µM a finalement été choisie pour la suite des manipulations.

### **8.5 TEST DE LA SENSIBILITÉ SUR LES DIFFÉRENTES PAIRES D'AMORCES**

Les paires d'amorces choisies en fonction de nos différentes cibles sont étudiées au niveau de leur sensibilité. La paire externe CT3B et CT8B ainsi que la paire interne CT11 et CT12 pour le gène *ppme*<sup>+</sup> ; la paire CpnA et CpnB pour le gène ribosomal; la paire externe CpHL1 et CpHR1 et la paire interne CpHR1 et CpHM1 pour le gène inconnu de Campbell sont testées sur de l'ADN issu d'une préparation de corps élémentaires de *C. pneumoniae* produit in vitro sur cellules en culture et diluée dans un extrait de cellules Mc-Coy afin d'imiter un échantillon clinique. L'extraction fut réalisée avec la méthode NaOH 80°C et des dilutions de 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-12</sup> sur cet ADN furent utilisées sur les différentes paires d'amorces. Après l'amplification au PCR (figure 4) nous avons remarqué visuellement sur gel d'agarose une sensibilité plus élevée chez la paire CpnA et CpnB lors de quatre expériences. Cette paire CpnA et CpnB permettait la visualisation d'ADN après amplification à une dilution plus grande c'est-à-dire 10<sup>-12</sup> que la paire CT12 et CT11 qui détectait jusqu'à 10<sup>-11</sup>. La paire CpHR1 et CpHM1 nous donnait des résultats variables généralement moins sensibles que CpnA et CpnB.

### **8.6 CONSTRUCTION DU CONTRÔLE POSITIF "pUC-PPME LONG"**

Ce pUC-PPME-long a été construit pour pouvoir le différencier des patients lors de la PCR, des patients portant le même gène *ppme*<sup>+</sup> des Chlamydiae amplifié par PCR avec les mêmes amorces. pUC-PPME sera donc utilisé comme contrôle positif et standard interne lors des

différentes PCR. Le plasmide utilisé pour sa construction est un recombinant de pUC contenant le gène *ppme*<sup>+</sup> de *C pneumoniae* (H. Cheriti, et col., résultats non publiés). Le produit de la ligation appelé plasmide pUC-PPME est digéré de façon partielle par BamHI (Pharmacia, Montréal, Canada). Les fragments sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1%, le fragment linéaire de la longueur initiale pUC-PPME est récupéré du gel et purifié par "freeze et squeeze" ou pression par congélation. Il est ensuite traité par la phosphatase alcaline (Pharmacia, Montréal, Canada), enzyme qui catalyse l'élimination des monophosphates qui se trouvent aux extrémités 5' de l'ADN. Ce traitement empêche l'ADN ligase de circulariser l'ADN de pUC-PPME sans l'addition d'un insert.

L'insert choisi ici est un ADN de Polyome (fourni gracieusement par le laboratoire du Dr Bourgaux ) qui n'a pas de site KpnI. Cet insert de polyome est amplifié par PCR avec les amorces ERL2 et CAT2 et digéré par MboI (Pharmacia, Montréal Canada) afin d'obtenir un fragment de 280 paires de base qui sera inséré par ligation (à bouts cohésifs) dans pUC-PPME, puisque les bouts cohésifs générés par MboI sont les mêmes que ceux générés par BamHI (GATC). La molécule d'ADN pUC-pneumoniae-insert recombinante est introduite dans la cellule hôte DH5 $\alpha$  (bactérie compétente) par transformation. Les plasmides recombinants sont sélectionnés par digestion enzymatique avec KpnI qui coupe de part et d'autre du gène *ppme*<sup>+</sup> sur le plasmide pUC-PPME et libère un fragment de 1000 paires de base (le gène *ppme*<sup>+</sup>), fragment qui est rallongé de 280 paires de bases lorsque l'insert de polyome est présent. La figure 5 nous montre la construction de pUC-PPME long avec toutes les étapes détaillées.

La mise en évidence du clone positif a été faite d'abord à l'aide du profil des fragments d'ADN générés par Kpn1 sur les différentes colonies (voir Figure 6). L'ADN des différentes

colonies à été obtenue par minipréparation selon la méthode décrite au paragraphe 7.4.5 et digéré par KpnI. Sur la piste 1 on remarque un fragment d'environ 1000 paires de bases qui représente le gène *ppme*<sup>+</sup> présent dans le plasmide original pUC-PPME. Sur la piste 2 ce fragment est remplacé par un fragment de 1280 paires de bases qui représente le gène *ppme*<sup>+</sup> rallongé de 280 paires de bases par l'insert. L'ADN du clone positif a été amplifié par PCR en parallèle avec le plasmide original avec les amorces CT11 et CT12 pour la vérification de la taille du clone. Le produit de la PCR a été séparé sur gel d'agarose 1% ( voir à la figure7). La présence d'une bande à 1000 pb chez le plasmide original, à la première piste et de 1280 pb chez le clone positif, à la deuxième piste, fut constatée.

L'ADN amplifié par PCR avec les amorces CT11 et CT12 a été digéré par les enzymes AluI et MspI et séparé sur gel de polyacrylamide 10%. La figure 8 montre la digestion enzymatique sur l'ADN amplifié du sérovar L2 de *C. trachomatis*, à la piste 3, le traitement sur l'ADN amplifié de pUC-PPME (notre plasmide original) à la piste 2 et le traitement sur l'ADN amplifié du clone positif pUC-PPME long à la première piste. Le profil des fragments observé démontre la taille attendue et confirme l'identité du clone.

Pour la reconfirmation de l'identité de notre clone positif, on a eu à séquencer, et le séquençage nous a apporté une preuve irréfutable de l'identité du clone positif pUC-PPME long dont les constructions serviront de standard interne. Ce contrôle pUC-PPME a été construit de manière à pouvoir le différencier des patients portant le même gène *ppme*<sup>+</sup> amplifié par PCR avec les mêmes amorces.

## 8.7 CONSTRUCTION DU CONTRÔLE POSITIF “pUC-ADNr court”

Le pUC-ADNr est un clone issu de l’insertion d’un fragment de 436 paires de bases provenant d’une amplification par la PCR du gène ribosomal 16S de *C. pneumoniae* avec les amorces CpnB et CpnA dans le plasmide universel pUC-AhD<sup>-2</sup> adaptateur appelé encore plasmide vecteur pUC-PCR.

### 8.7.1 CONSTRUCTION DU PLASMIDE UNIVERSEL vecteur pUC-PCR

Le vecteur pUC-PCR est un hybride issu de *Pmal-p2* modifié et de *Puc-19*. Le site AhdI dans le gène de la bêta-lactamase de *Pmal-p2* est éliminé et deux sites AhdI sont créés dans le site de clonage multiple. Ces modifications sont ensuite transférées de *Pmal-p2* à *Puc-19*. Les étapes de la construction de ce vecteur sont présentées à la figure 9 et les chapitres qui suivent.

#### 1) élimination du site AhdI du gène de la bêta lactamase et création de Pmal-p2 AhD<sup>-</sup>

*Pmal-p2* subi un traitement enzymatique par AhdI et DraI et donne des fragments DraI—DraI de 5100 paires de bases; DraI—Ahd de 1425 paires de base et de AhdI—DraI de 175 paires de base. Dans un autre tube *Pmal-p2* est traité de façon indépendante par AhdI et donne une molécule linéaire de 6700 paires de bases. Les deux ADNs sont mélangés de façon équimolaires et d’éventuels bris monocaténares sont réparés par la ligase, deux heures à 16°C. On a chelaté le MgCl<sub>2</sub> des tampons par l’ajout d’EDTA 10mM final (car le MgCl<sub>2</sub> inhibe la dénaturation de l’ADN). On a augmenté la concentration saline à 100mM de NaCl et les ADNs furent précipités avec deux volumes d’éthanol, le culot est resuspendu dans 30µl



de tris 10mM, 0.3mM de NaCl. Après une dénaturation de 20 minutes à 95°C, on a incubé toute la nuit à 65°C pour la renaturation des brins. Parmi d'autres hétéroduplexes formés il a du se former les appariements d'un brin de 6700 bases issu de *Pmal-p2* traité par AhdI et un autre brin de 5100 bases venant de *Pmal-p2* traité par AhdI et DraI. En ajoutant un adaptateur phosphorylé (TATCTACACAAACGGGGAGTC) qui correspond au site AhdI, mais avec un nucléotide A à la place du G dans la séquence de reconnaissance de AhdI (GACNNN'NNGTG) l'hétéroduplexe peut être circularisé.

Le linker devrait s'apparier instantanément avec le *Pmal-p2*, pendant l'incubation de 10 minutes à 50°C, puisque dans 40µl de mélange, il ya 1µM de l'ADN de l'adaptateur comme dans une PCR. Il s'en suit une réaction de réparation avec l'enzyme polymérase Klenow, les quatre dNTPs et la ligase pour que le cercle soit à deux brins sur toute sa longueur. Cet ADN est utilisé pour transformer *E. coli*. Plutôt que d'analyser les colonies, l'ensemble des bactéries transformées est cultivé et l'ADN extrait d'un échantillon. Cet ADN est enrichi pour les plasmides ayant perdu le site AhdI par une digestion avec AhdI. Après transformation et repiquage de seize colonies, l'ADN des minipréparations est digéré par AhdI et PstI puis analysé. Treize colonies sont identifiées, ayant perdu le site AhdI. Une des colonies est choisie et appelées *Pmal-p2 Ahd<sup>-</sup>*.

## 2) création d'un site AhdI dans le MCS de *Pmal-p2 Ahd<sup>-</sup>*

Un adaptateur phosphorylé TCGACTCTGTGTCGACAAAAAGTCTGCA avec un hémisite PstI à l'extrémité droite et un hémisite SalI à l'extrémité gauche, (le site AhdI est souligné) est inséré dans *Pmal-p2* ordinaire traité par SalI et PstI. Après la ligation on obtient un *Pmal-p2* adaptateur Ahd, le traitement par SalI-PstI permettra de vérifier sur gel acrylamide de 10%

l'augmentation de la taille du site de clonage multiple de 163 paires de base à 181 paires de base. Afin de combiner sur un même vecteur le site AhdI au site de clonage multiple (MCS) et le gène de la bêta-lactamase sans AhdI, les deux plasmides sont digérés par BspHI. Cette enzyme coupe le plasmide deux fois créant deux fragments, un qui porte le gène de la bêta-lactamase et l'autre le reste du vecteur y compris le MCS. Afin de favoriser la recombinaison des fragments voulus, d'autres enzymes qui coupent exclusivement dans l'un ou l'autre fragment sont employés.

L'enzyme DraI qui coupe le gène de la bêta-lactamase est utilisé sur le plasmide avec AhdI au MCS et BamHI est employé pour couper le MCS de Pmal-p2 Ahd<sup>-</sup>. On inactive les enzymes puis on mélange dans la proportion de un pour un, suivie d'une ligation à 16°C pendant 3 heures. Après la ligation de ces deux ADNs, on obtient un Pmal-p2 Ahd<sup>-</sup> Linker Ahd.

### 3) création d'un deuxième site AhdI dans le MCS de Pmal-p2 Ahd<sup>-</sup> adaptateur Ahd.

a- création de pUC-adaptateur - EcAhKp. *Puc-19* est digéré par EcoRI et KpnI (on perdra le site SacI qu'on remplacera par AhdI) en insérant l'adaptateur EcAhKp phosphorylé 5'AATTCGACTTTAAGTCGGGTAG3'. La présence d'un site AhdI supplémentaire est vérifiée (celui dans le gène de la résistance à l'ampicilline et celui dans le site de clonage multiple) par digestion enzymatique.

### b- transfert du MCS de pUC-adaptateur-EcAhKp dans Pmal-p2 Ahd<sup>-</sup> Linker Ahd.

Le site AhdI dans le MCS pUC-adaptateur-EcAhKp a été transféré à Pmal-p2 Ahd<sup>-</sup> adaptateur Ahd après traitement des deux plasmides par EcoRI et SalI d'une façon analogue à celle

employée pour créer Pmal-p2 Ahd<sup>-</sup> adaptateur Ahd. Ainsi nous avons dans le MCS deux sites AhdI séparés de 38 paires de bases.

4. transfert des modifications subies par Pmal-p2 -Ahd<sup>-</sup>2 adaptateur dans *pUC-19* et création de pUC-Ahd<sup>-</sup> 2 adaptateur.

a- transfert du fragment BspHI contenant le gène de la bêta-lactamase sans site AhdI dans *Puc19* et création de pUC-Ahd<sup>-</sup>:

pUC-Ahd<sup>-</sup> est crée en transférant un fragment BspHI d'environ 1500 paires de base de Pmal-p2 Ahd<sup>-</sup>, dans *pUC-19*. *pUC 19* perd son fragment BspHI de 1100 paires de base au profit du fragment BspHI venant de Pmal-p2 Ahd<sup>-</sup>. Donc la taille de pUC-Ahd<sup>-</sup> est de 3100 paires de base versus 2700 pour le *pUC-19* ordinaire .

b- transfert du MCS de Pmal-p2 -Ahd<sup>-</sup>2 adaptateurs dans pUC-Ahd<sup>-</sup> et création du vecteur

pUC PCR: le site de clonage multiple de Pmal-p2 Ahd<sup>-</sup> 2 adaptateurs a été transféré dans pUC Ahd<sup>-</sup> en digérant les deux plasmides par EcoRI et HindIII. On vérifiera l'obtention du clone pUC-Ahd<sup>-</sup> 2 adaptateurs par l'apparition de site AhdI dans un plasmide puc de 3100 paires de base. Il n'est pas possible de vérifier la présence des deux sites par digestion aux enzymes de restriction puisque les sites sont trop rapprochés. La construction de ce plasmide vecteur pUC-PCR est présentée à la figure 9A.

### 8.7.2 PRODUCTION DU CONTRÔLE POSITIF pUC-ADNr court par clonage du gène 16S ribosomal de *C. pneumoniae* dans le vecteur pUC-PCR

La construction du clone positif pUC-ADNr par clonage du petit fragment de 436 paires de bases du gène ribosomal 16S issu d'une amplification par PCR avec les amorces CpnB et CpnA dans ce plasmide vecteur pUC-PCR est présenté à la figure 11 et dans les paragraphes qui suivent.

#### a) Clonage de l'ADNr de *C.pneumoniae*

Les premières tentatives de cloner des produits de PCR dans le vecteur pUC-PCR se sont avérées infructueuses puisque le bruit de fond des recombinants potentiels sans insert était trop élevé.

Nous avons découvert que ce bruit de fond élevé provenait de molécules d'ADN plasmidique à simple brin et donc réfractaires au traitement par les enzymes de restriction mais toujours capables d'initier la transformation. Le plasmide vecteur pUC-PCR a été traité par la nucléase "Mung bean" pour éliminer les molécules d'ADN à simples chaînes qui peuvent nuire au clonage. On a complété ce traitement AhdI par une digestion avec KpnI pour éliminer un petit fragment d'ADN du MCS entre les deux sites AhdI. Un traitement à la chaleur de 30 minutes à 85°C inactive les enzymes AhdI et KpnI et dénature les petits fragments d'ADN les empêchant de permettre la circularisation du vecteur sans insert. L'ADN de l'insert de 436 paires de base, issu de l'amplification par PCR avec les amorces CpnB et CpnA sur le gène ribosomal de *C. pneumoniae* est purifié par la méthode de la haute purification des produits de PCR (décrite au paragraphe 7.3.1). Après purification les deux ADN, celui de l'insert purifié et celui du plasmide digéré sont ligaturés ensemble. La transformation a été réalisée selon la méthode décrite au paragraphe 7.4.4. et les bactéries transformées ont été étalées sur

des boîtes de pétris contenant de l'ampicilline. La digestion enzymatique avec EcoRI et HindIII de l'ADN des différentes colonies a permis de mettre en évidence le clone positif. L'identification a été confirmée par une digestion enzymatique avec PvuII. Les produits de la digestion ont été séparés sur gel d'agarose 1% (voir à la figure 10 pour EcoRI et HindIII et à la figure 11, le traitement avec PvuII). Chez les clones ayant incorporé un insert de 436 paires de base, la digestion par EcoRI et HindIII a libéré un fragment d'environ 500 paires de base tandis que la digestion avec PvuII a généré un fragment de 782 paires de base. Sur les deux figures 11 et 12, la piste 1 contient le recombinant positif avec son insert de 436 paires de bases dans le site de clonage multiple du plasmide et la piste 2, le plasmide original. Ces deux plasmides ont été amplifié par PCR avec les amorces CpnA et CpnB.

Les produits de la PCR ont été séparés sur gel d'agarose 2% (voir à la figure 12) et la bande à 436 pb fut visualisée dans la piste 1 préparée avec le recombinant positif. Cette bande n'est pas produite à partir du plasmide original (piste 2) puisque ce dernier ne contient pas le gène de l'ADNr.

#### **b) modification de pUC-ADNr pour créer un contrôle positif pour la PCR.**

La taille de l'ADNr cloné devra être modifiée afin de la différencier du produit de la PCR des patients ayant le gène ribosomal intact et qui sera amplifié avec les amorces CpnA et CpnB. Nous avons décidé de raccourcir le gène cloné en le digérant avec les enzymes HpaI et BsaAI (New England Biolab) qui ne coupent pas *pUC-19* mais qui coupent l'insert ADN<sub>r</sub> produit par CpnA et CpnB en libérant un fragment de 62 paires de base. Après une ligation à bouts francs, on a obtenu un clone avec le gène ribosomal de *C. pneumoniae* raccourci. Le traitement de l'ADN des colonies avec les enzymes EcoRI et HindIII ( figure 13), et PvuII

(figure 14) confirment l'efficacité de cette démarche. Sur ces figures, le plasmide raccourci a donné des fragments plus courts d'environ 440 pb avec digestion par EcoRI et HindIII et de 220 pb dans le cas de PvuII. L'amplification par PCR avec les amorces CpnB et CpnA du clone positif raccourci a donné un fragment de 374 paires de bases (figure 15, piste à gauche de M), et le plasmide pUC ADN<sub>r</sub> produit un ADN (2 pistes à droite de M) de 436 paires de base.

Cette diminution de la taille de l'insert nous permettra de différencier les produits du PCR générés à partir du contrôle positif pUC-ADN<sub>r</sub> court de celui des patients ayant le gène ribosomal de *C. pneumoniae* intact lors de l'amplification par les mêmes amorces CpnB et CpnA.

### **8.8 DÉTECTION DE *C. pneumoniae* DANS LES SÉCRÉTIONS RESPIRATOIRES DES PATIENTS**

La détection des Chlamydiae par la PCR dans les sécrétions respiratoires de 139 patients, a été réalisée afin de tester notre méthode mise au point, avec les paires d'amorces CpnA, CpnB et avec CT3B,CT8B (pour la première PCR) suivie de CT12, CT5B (pour la deuxième PCR), pour chaque série de spécimen. Les contrôles positifs (pUC-PPME long pour les 2 paires CT3B, CT8B et CT12, CT5B et pUC ADN<sub>r</sub> court pour CpnA et CpnB) ont été ajoutés également dans chaque spécimen de patient. Ainsi pour chaque série nous avons réalisé une amplification par PCR avec les échantillons seulement et une amplification par PCR avec les échantillons mélangés à 100 copies du témoin positif. La figure 16 montre l'amplification obtenue avec la paire d'amorces CpnA et CpnB d'une série d'échantillon additionnée de 100 copies du témoin positif pUC ADN<sub>r</sub> court. Le produit de la PCR a été

séparé sur gel d'agarose 2%. On note la présence de deux bandes de 436 pb ( la cible naturelle) et de 374 pb pour le témoin positif. Les pistes 3, 12, et 24 montrent une bande à 436 paires de base correspondante à celle du gène ribosomal 16S de *C. pneumoniae* amplifié par PCR avec les amorces CpnA et CpnB. Ces patients sont alors considérés comme positifs puisqu'ils contiennent *C. pneumoniae* dans leurs sécrétions respiratoires.

L'amplification par la PCR des mêmes échantillons sans contrôle positif avec les amorces CpnA et CpnB est présenté à la figure 17. Les pistes 3, 12, et 24 ont encore montré la présence d'une bande à 436 pb qui témoigne de la présence de *C. pneumoniae* dans les sécrétions respiratoires de ces patients.

La détection a été faite également sur la même série d'échantillons, mais avec d'autres paires d'amorces, les paires d'amorces CT3B,CT8B suivie de CT12, CT5B. 100 copies du contrôle positif pUC PPME long furent ajoutées dans chaque spécimen de patient. À la figure18, la présence d'une bande d'environ 1000 pb dans les pistes 3, 12, et 24 obtenue des sécrétions respiratoires indique des patients positifs avec *C. pneumoniae* dans leurs sécrétions respiratoires. À la figure 19 l'amplification par PCR avec les amorces CT3B, CT8B suivies de CT12, CT5B, de la même série d'échantillons mais sans contrôle positif a présenté une image un peu différente. Les pistes 3 et 12 ont montré la bande typique de *C. pneumoniae* tandis que le patient 24 présente un résultat négatif bien qu'il ait été positif avec CpnA et CpnB avec et sans contrôle positif et avec CT12, CT5B avec contrôle positif.

Pendant nos essais, on a également retrouvé 3 tubes négatifs même s'ils contenaient des témoins positifs, ceci suggérant la présence d'inhibiteurs à PCR dans ces tubes. Nous avons pu surmonter ce problème en diluant les échantillons 50 fois.

L'étude de 137 spécimens cliniques avec les deux paires d'amorces avec et sans les contrôles positifs a permis d'identifier 19 spécimens positifs sur ces analyses. Il n'a été noté aucun spécimen positif seulement pour une des paires d'amorces. Quatre spécimens donnaient des bandes faibles pour les deux séries de marqueurs. Il était intéressant de voir que les quatre spécimens faiblement positifs provenaient de lavages bronchoalvéolaires de patients avec pneumonie.

Parmi les 139 spécimens il y avait 81 prélèvements de gorges dont 10 positifs ou 12.2%. Il y avait quatre spécimens d'aspirat nasopharyngé positifs sur 20 ou 20%. Parmi les 22 lavages bronchoalvéolaires il y avait cinq (5) échantillons positifs soit 22.7%. Enfin sur 11 autres spécimens de liquides pleuraux ou péricardiques et biopsies pulmonaires, aucun n'était positif.

Afin d'identifier l'organisme détecté chez ces patients, on a digéré les produits du gène *ppme*<sup>+</sup> amplifié par PCR par des enzymes de restriction (figure 20). Les fragments générés par digestion avec MspI- AluI de l'ADN amplifié de quatre patients positifs ainsi que l'ADN de la souche TWAR fournie par Dre Peeling servant de contrôle furent analysés sur gel de polyacrylamide à 10%. On constate sur cette figure que le profil des fragments présentés par les différents échantillons ne diffère pas de celui de la souche de référence TWAR d'où la confirmation de l'identité de la bactérie (*C. pneumoniae*) détectée dans les sécrétions respiratoires des patients avec les amorces CT3B-CT8B suivie de CT12 et CT5B en a, en b, les paires CT3B-CT8B suivie de CT12 et CT11; en c, la paire CpnA et CpnB. Les pistes 1 en



a, en b et en c, l'ADN du patient numéro 3 digéré par MspI AluI, les pistes 2 en a, en b, et en c le patient numéro 12, les pistes 3 en a, en b, et en c, le patient numéro 24., les pistes 4 en a, en b et en c, le patient numéro 51 et les pistes 5 en a, en b et en c, le contrôle positif TWAR et amplifiée par ces différentes paires d'amorces en a, en b et en c respectivement.

### **8.9 TEST DE QUANTIFICATION DE L'ADN ISSU DE QUATRE ÉCHANTILLONS DE PATIENTS POSITIFS, AMPLIFIÉS PAR PCR AVEC LES AMORCES *CpnA* ET *CpnB***

L'ADN de quatre échantillons de patients a été extrait par la méthode NaOH décrite au paragraphe 7.1.2. L'extrait est dilué 10 fois puis amplifié avec 0, 10, 100 et 500 copies du contrôle positif pUC ADN<sub>r</sub> court. Le produit de la PCR a été séparé sur gel d'agarose 2% (voir résultats à la figure 21) et l'intensité des bandes à 436 pb pour les échantillons de patients et 374 pb pour le contrôle positif, a été évaluée visuellement pour la détermination du nombre de copies présentes chez un patient. Pour le patient 1, sur la deuxième piste, il est évident que le spécimen du patient contient plus de 10 copies puisque l'intensité de la bande du patient à 436 paires de bases est beaucoup plus grande que la bande témoin 10 copies. À la piste 3 le patient contient un peu plus d'ADN que le témoin 100 copies mais moins que le témoin 500 copies à la piste 4. On estime que le spécimen du patient contient environ 200 copies. Puisque nous avons dilué le spécimen 10 fois avant de faire cette analyse et qu'un spécimen de 50 µl était employé au départ, nous pouvons calculer que dans 1 ml du spécimen il y avait environ 40,000 corps élémentaires de *C. pneumoniae*. Les spécimens 1, 2 et 4 contenaient une quantité similaire d'ADN mais environ deux fois plus que le spécimen 3. Les

spécimens 1, 2 et 3 provenaient d'aspirats nasopharyngés de bébé tandis que le spécimen 4 était un lavage broncho-alvéolaire d'un patient avec pneumonie sévère.

**TABLEAU COMPARATIF DES RÉSULTATS D'ANALYSE DE LA  
DéTECTION DE *C. PNEUMONIAE* CHEZ 139 PATIENTS**

			CT 3b 8b ; CT12 + 5b (PPME)			
			Avec contrôle Positif		Sans contrôle Positif	
			+	-	+	-
<b>CpnA et CpnB (16-S ribosomal)</b>	Avec contrôle Positif	+	19	0	18	*1
		-	0	118	0	118
	Sans contrôle Positif	+	19	0	18	*1
		-	0	118	0	118

\* L'inhibition du PCR a été observée sur un échantillon positif et trois échantillons négatifs pour *C. Pneumoniae*.

## DISCUSSION

L'objet de cette étude était la mise au point d'une méthode de détection par PCR de *C. pneumoniae* dans les sécrétions respiratoires et dans le sang des patients. Plusieurs paramètres ont d'abord été étudiés:

- Trois méthodes d'extractions appelées NaOH 80°C; NaOH 95°C et méthode PK-lyse ont été évaluées avant de choisir la méthode NaOH 80°C comme celle qui permet d'extraire de façon optimale l'ADN, ainsi que les paramètres de la PCR comme:

→ la concentration de  $MgCl_2$  dans le tampon de la réaction de la PCR,

→ les concentrations des dNTPs dans la réaction,

→ l'identification des paires d'amorces les plus sensibles à *C. pneumoniae* pour une amplification maximale de l'ADN extrait.

- le développement de deux PCRs, la deuxième étant aussi sensible que la première.
- la production de deux contrôles positifs, un à partir du gène *ppme*<sup>+</sup> de *C. pneumoniae*, appelé pUC-PPME long et un autre à partir du gène ribosomal 16S de *C. pneumoniae*, appelé pUC ADNr court. Contrôle positifs qui nous serviront d'étalon de quantification et de sensibilité. Ces constructions serviront de standard interne. Comme étalon de quantification, ils nous permettront de savoir la quantité de molécules d'ADN bactériennes présentes chez un patient. Comme étalon de sensibilité, ils nous permettront de détecter l'existence des inhibiteurs à PCR dans un tube pouvant générer les faux négatifs.

- À l'aide de ce protocole de la PCR mis au point avec les amorces pour nos différentes cibles visées: le gène ribosomal 16S de *C. pneumoniae*, dont la séquence est spécifique à cette souche et le gène *ppme*<sup>+</sup> de *C. pneumoniae*, 137 spécimens cliniques ont été analysés.

Les méthodes NaOH 80°C, NaOH 95°C et la PK lysis (décrites au paragraphe 7.1.2) ont été testées sur une souche de TWAR. Ainsi la méthode NaOH 80°C a semblé être la meilleure puisqu'elle nous a permis d'extraire de manière optimale, l'ADN. Plusieurs autres auteurs ont trouvé que la méthode PK lyse permettait une bonne extraction d'autres germes (Frost et coll., 1993. Erlich et coll., 1989. Saiki et coll., 1986) bien que Gnarp et Eriksson; (1995) et Mass et Dalhoff (1994) l'avaient trouvé moins efficace que d'autres méthodes d'extraction de l'ADN de *C. pneumoniae* et Gaydos et coll (1994) ont trouvé qu'il ne permettait pas la détection de tous les positifs. Il est possible que notre protocole au NaOH 80°C éliminait efficacement les porphyrines à la première centrifugation car les globules rouges étaient laqués. Il n'est pas évident de savoir pourquoi le NaOH 95°C fonctionnait moins bien que le NaOH 80°C. L'efficacité de NaOH 80°C à éliminer les inhibiteurs de la PCR a été bien documenté dans cette étude puisque le contrôle positif a été amplifié dans 134 des 137 spécimens de patients amplifiés. On peut peut-être expliquer l'extraction moins efficace de la PK ici dans nos essais par l'inactivation incomplète par la chaleur de la protéinase K, car une petite quantité de la protéinase K toujours active peut affecter l'amplification en digérant l'enzyme Taq polymérase. Également la présence des composés porphyrines dérivés du sang peuvent inhiber et diminuer la qualité de l'amplification.(Erlich et coll., 1989).

Nous avons démontré que la variation de la concentration de  $\text{MgCl}_2$  dans le tampon de la PCR ne semble pas affecter de manière significative la sensibilité et l'efficacité de la PCR avec les amorces CT3B-CT8B pour la PCR externe suivi de la paire CT12-CT11 ou la paire CT12-CT5B pour l'interne ni pour la paire CpnA et CpnB. D'après la littérature la concentration de  $\text{MgCl}_2$  peut apporter des effets marqués sur la spécificité et la sensibilité de la PCR. La plupart des études emploient 1.5mM  $\text{MgCl}_2$  avec 200 $\mu\text{M}$  de chaque nucléotide (dNTP) tout comme nous l'avons établi. Dans certaines circonstances, différentes concentrations de  $\text{Mg}^{2+}$  peuvent être nécessaires. Ceci explique les résultats obtenus avec les paires d'amorces CpHR1 et CpHL1 pour la première PCR qui semble mieux fonctionner avec une concentration de 0.75mM suivi de la deuxième paire CpHR1 et CpHM1 avec 3mM. Ce résultat est conforme avec celui obtenu par Campbell et collaborateurs (1992). Généralement un excès de  $\text{Mg}^{2+}$  (3.5, à 10 mM) entraîne une accumulation de produits non spécifiques et, une insuffisance des ions  $\text{Mg}^{2+}$  comme 0.5 mM réduit l'intensité de l'amplification de la séquence cible ( Erlich et coll.,1989), limitant ainsi sa sensibilité. Lors de variation de la concentration de  $\text{MgCl}_2$  aucun effet n'a été détecté sur la sensibilité et la spécificité de l'amplification. Ceci peut s'expliquer par le fait que les amorces fonctionnaient déjà bien à de faibles concentrations de  $\text{MgCl}_2$  et que d'autres cibles qui auraient pu fonctionner avec une concentration supérieure de  $\text{MgCl}_2$  grâce à des séquences similaires mais non identiques aux amorces, n'étaient pas présentes. Notons que pour la suite du projet, l'amplification par PCR avec ces différentes paires d'amorces s'est donc faite avec une concentration de 1.5mM de  $\text{MgCl}_2$

Nous avons pu conclure d'après nos résultats que la variation de la concentration des dNTPs ne modifie que très légèrement l'efficacité de la PCR. Les deoxynucléotides triphosphates sont usuellement présents à raison de 50 à 200 $\mu$ M chacun. Une forte concentration de dNTP peut provoquer une mauvaise incorporation par la polymérase et une faible concentration limitent la quantité d'ADN synthétisée (Erlich et coll., 1989 ). Puisqu'il n'y avait que peu de produit non-spécifique synthétisé dans nos réactions, la quantité de dNTP n'a jamais été limitatif. Nous n'avons pas essayé des quantités élevées de dNTP qui pouvaient compromettre l'amplification. La littérature ( Erlich et coll., 1989) explique que les dNTP apparaissent liés quantitativement le  $MgCl_2$ , la quantité de dNTP présents dans la réaction détermine la quantité de  $MgCl_2$  libre et utilisable.

Après avoir choisi la meilleure méthode d'extraction et les conditions de la PCR les plus adaptées pour une meilleure amplification, il a fallu également tester la sensibilité d'une dizaine de paires d'amorces et choisir en fonction des cibles visées, les plus sensibles et spécifiques à *C. pneumoniae*. Les résultats ont montré une sensibilité plus élevée chez la paire CpnA et CpnB qui détecte des particules bactériennes jusqu'à une dilution de  $10^{-12}$ . Le groupe de Frost et collaborateurs (1993 et les résultats non publiés.) a étudié, vérifié la sensibilité de certaines paires d'amorces pour la PPME de *C. trachomatis* en développant la PCR nichée ceci pour pouvoir augmenter la sensibilité des amorces. Cette PCR nichée a été utilisée avec des amorces modifiées pour amplifier *C. pneumoniae* plutôt que *C. trachomatis* lors de la détection de *C. pneumoniae* dans les échantillons des patients. L'utilisation d'une PCR nichée avec les amorces les plus sensibles peut expliquer la sensibilité élevée observée chez les paires d'amorces Ct3B -Ct8B pour la PCR externe et la paire CT12-CT5B pour la PCR nichée.

Une PCR avec une seule paire d'amorce pour PPME s'est déjà montrée peu sensible (Frost et coll., 1993; Kaltenboeck et coll 1993). Les deux séries d'amorces ont probablement la même sensibilité sur des spécimens cliniques puisque les 19 spécimens positifs pour *C. pneumoniae* l'étaient avec les deux paires d'amorces, même s'ils présentaient une faible quantité de bande d'ADN amplifié.

La production des contrôles positifs était indispensable lors de la réalisation de ce projet, car on pouvait les utiliser comme étalon de quantification et de sensibilité. Ils ont aidé à contrôler la présence des inhibiteurs qui peuvent générer des faux négatifs et en même temps quantifier l'ADN détecté pour vérifier la sensibilité de la technique et vérifier le nombre de copies de *C. pneumoniae* dans une infection (Frost et coll., 1995). Plusieurs études rapportent la présence des inhibiteurs de la PCR, par exemple le cas de la méthode de culture pour *C. trachomatis* qui indique une sensibilité inférieure à 100% donc la présence d'une inhibition probable (Quinn et coll 1994; Frost et coll 1995 ; Gnarp et coll 1995.). Peu d'études utilisent des contrôles positifs. Nous avons produit par clonage deux contrôles positifs pUC-PPME long et pUC-ADNr court. Le pUC-PPME long a été produit à partir d'un plasmide recombinant pUC-PPME par l'insertion d'un fragment d'ADN du virus du polyome.

La construction du deuxième contrôle positif a nécessité la production d'abord, d'un plasmide universel vecteur pUC-PCR, plasmide ayant deux sites AhdI éloignés dans son MCS, et ayant perdu le site AhdI dans son gène de la bêta-lactamase. Ce plasmide peut être utilisé pour le clonage de tous les produits de la PCR amplifié à l'aide de la Taq polymérase. (la figure 9 présente la construction de ce plasmide).

Nous avons d'abord construit un clone positif pUC-ADNr par clonage du fragment de 436 paires de bases du gène ribosomal 16S issu d'une amplification par PCR avec les amorces CpnB et CpnA dans le plasmide universel puc vecteur PCR. Pour différencier ce clone positif de l'ADN extrait des patients, il a fallu soit rallonger, soit raccourcir la taille du petit fragment du gène ribosomal 16S amplifié par la PCR avec les amorces CpnA et CpnB. Nous avons choisi de la réduire en enlevant la portion située entre deux sites de clivage d'enzymes BsaAI et HpaI, deux enzymes qui ne coupent pas le plasmide sauf dans l'insert du petit fragment de 436 paires de bases, occasionnant la perte d'un fragment de 62 paires de bases. Grâce à ces contrôles positifs on a pu découvrir 3 négatifs qui auraient pu être positifs, parmi les 137 patients analysés soit 2% d'inhibition. Ceci nous prouve l'importance d'un contrôle positif surtout lors de la détection des *Chlamydiae* dans des sécrétions respiratoires souvent difficile à extraire à cause de la présence de plusieurs autres micro-organismes et dans le sang à cause de sa teneur protéique élevée. Le groupe de Maass (1994) a trouvé beaucoup plus de faux négatifs passant de 12% de positif si l'extraction a été réalisée avec la méthode Pk lyse à 31% lorsque la méthode à la chaleur fut employée. On peut expliquer la présence de moins de faux négatifs découverts grâce à nos témoins positifs par la bonne extraction au NaOH 80°C qui doit éliminer efficacement les inhibiteurs à PCR dans la plupart (98%) des spécimens.

Après avoir mis au point un test au PCR en choisissant la meilleure méthode d'extraction d'ADN, les conditions optimales de réactions pour une amplification, les cibles les plus sensibles, et en produisant des contrôles positifs ou encore, des étalons de quantifications et de sensibilité, et enfin en développant deux PCRs chacun servant de contrôle à l'autre, on a débuté la détection proprement dite chez les patients.



La recherche de *C. pneumoniae* dans les extraits respiratoires de 137 échantillons de patients par la méthode NaOH 80°C a été réalisée. Les résultats compilés dans le tableau récapitulatif nous montrent 19 patients positifs soit 13.9% de positifs alors que d'autres études nous rapportent 5 à 10% de la détection de *C. pneumoniae* par PCR dans les échantillons respiratoires (Grayston, 1992; Marrie et coll 1990). Tandis que d'autres ont trouvé des prévalences plus importantes (Maass et Dalhoff 1994., Gnarpe et Erickson., 1995). Le fait que tous les positifs CpnA et CpnB soient également positifs avec PPME et avec les deux témoins positifs démontre probablement qu'il n'y a pas de faux négatifs et que les deux paires d'amorces ont une sensibilité similaire. Ceci confirme surtout qu'il n'y a pas de faux négatifs, car un faux positif par une paire d'amorces ne sera pas positif par l'autre paire. Un résultat similaire a également été démontré par une des premières études réalisées par Mahoney et coll (1992) qui ont utilisé une deuxième paire d'amorces pour confirmer les échantillons positifs au premier. Pendant nos essais, on a également retrouvé des tubes négatifs même s'ils contenaient des témoins positifs, ceci démontrant la présence des inhibiteurs à PCR dans ces tubes. Nous avons pu surmonter ce problème par la dilution des échantillons. D'après les caractéristiques de nos prélèvements on a découvert *C. pneumoniae* dans 12.2% des échantillons issus de la gorge, 20% d'aspirats nasopharyngés pour bronchiolite et 22.7% de lavage bronchealveolaires alors que les études réalisées par Grayston (1992) démontraient 5 à 10% de pneumonie causée par *C. pneumoniae*. Ces mêmes études rapportent que 50% des adultes montrent une évidence séroépidémiologique et que les jeunes enfants n'étaient pas généralement considérés comme un groupe à risque pour *C. pneumoniae* car la courbe de séroconversion montre un accroissement de la prévalance à 5-20 ans. Kuo et collaborateurs (1995) avec la MIF ont trouvé des résultats similaires, sauf pour le groupe de Hammerschlag (1992) qui a trouvé des infections chez de jeunes enfants.

Dans notre étude nous avons trouvé 20% des aspirats nasopharyngés positifs pour *C. pneumoniae*. Chez les enfants de moins de 2 ans.

La caractérisation et l'identification de l'organisme présent chez ces patients ont été faites par une digestion enzymatique par MspI-AluI sur quatre des échantillons positifs, la souche TWAR servant de témoin. Ceci confirme la présence de *C. pneumoniae* dans ces échantillons.

Le test de la quantification nous a permis d'estimer le nombre de molécules bactériennes chez quatre des patients soit 20,000 à 40,000 particules bactériennes par ml. C'est l'une des premières études de la quantification réalisées sur *C. pneumoniae*, d'autres études de la quantification ont été mises au point mais sur *C. trachomatis* (Frost et coll., 1995). En clinique, on considère qu'il faut une concentration supérieure à 1,000 bactéries par ml de sécrétions respiratoires pour considérer la bactérie comme cause de l'infection. Selon ce critère, *C. pneumoniae* peut être la cause de l'infection dans les cas présentés ici.

Le tableau récapitulatif regroupe les résultats des analyses de la détection de *C. pneumoniae* chez 137 patients. Ce tableau met en évidence une sensibilité et une spécificité égale entre les deux PCRs in vivo même si in vitro, la paire CpnA et CpnB paraissait plus sensible. En effet, on a autant de positif et autant de négatif chez CpnA et CpnB que chez CT12 et CT5b et sur les mêmes échantillons.

## CONCLUSION

Au terme de cette étude on a pu mettre au point un test au PCR pour détecter de manière spécifique et sensible *C. pneumoniae* dans les sécrétions respiratoires des patients. Et ceci, en développant une sensibilité optimale et une bonne spécificité de la méthode.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Aldous, M. B., Grayston, J. T., Wang, S.-P, and Foy, H. M. (1992). Seroepidemiology of *C. pneumoniae* TWAR infection in Seattle families, 1966-1979. J. infect. Dis. 166: 646-649.

Baehr, W., Y.X. Zhang, T. Joseph, H. Su, F.E. Nano, K.D.E. Everett et H. D. Caldwell (1988). Mapping antigenic domains expressed by *C. trachomatis* major outer membrane protein genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 4000-4004.

Bavoil, P., A. Ohlin et J. Schachter (1984). Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *C. trachomatis*. Infection and immunity 44: 479-485.

Bedson, S. P., G. T. Western et S. Levy-Simpson (1930). Observations of the aetiology of psittacosis. Lancet I: 235-236.

Black, C. M., J. E. Johnson, C. E. Farshy, T. M. Brown et B. P. Berdal (1991). Antigenus variatio among strain *C. pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 29(7): 1312-1316.

Blasi, F., Denti, F., Erba, M., Cosentini, R., Raccanelli, R., Rinaldi, A., Fagetti, L., Esposito, G., Ruberti, U et Allegra, L. (1996). Detection de *C. pneumoniae* but not *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms. J. Clin. Microbiol; 34: 2766-2769.

Bowie, W. R. et H. Jones (1981). Acute pelvic inflammatory disease in outpatients: association with *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*. *Ann. Intern. Med.* 95: 685-688.

Brade, H., L. Brade et F. E. Nano (1987). Chemical and serological investigations on the genus specific lipopolysaccharide epitope of *C. trachomatis* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 2508-2512.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Brunham, R. C., C. -C. Kuo, C. E. Stevens, and K, K, Holmes. (1982). Therapy of cervical chlamydial infection. *Ann. Intern. Med.* 97:216-219.

Caldwell, H. D. et Hitchcock, P. J. (1984). Monoclonal antibody against a genus-specific antigen of *Chlamydia* species: location of the epitope on chlamydial lipopolysaccharide. *Infet. Immun.* 44:306-314

Caldwell, H. D., Kuo, C.C, et Kenny, G.E. (1995). Antigenic analysis of *Chlamydiae* by two dimensional immunoelectrophoresis. I. Antigenic heterogeneity between *C. trachomatis* and *C. psittaci*. *J. Immun.* 115: 963-968

Campbell, L. A., C. C. Kuo, and J. T. Grayston. (1987). Characterization of the new *C.* agent, TWAR, as a unique organism by restriction endonuclease analyses and DNA-DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1911-1916.

Campbell, L. A., C. C. Kuo., Wang, S.-P, and J. T. Grayston. (1990). Serological response to *C. pneumoniae* infection. *J. Clin. Microbiol.* 28(6): 1261-1264.

Campbell, L. A., M. Perez Melgosa, D. J. Hamilton, C. C. Kuo, and J. T. Grayston. (1992). Detection of *C. pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30: 434-439.

Campbell, L. A., O'Brien, E. R., Cappuccio, A. L., Kuo, C. C., Wang, S. P., Stewart, D., Patton, D. L., Cummings, P. K and Grayston J. T. (1995) Detection of *C. pneumoniae* TWAR in human coronary atherectomy tissues. *J. Inf. Dis* 172: 585-588.

Carter, M. W., Al-Mahdawi, S. A. H., Giles, J. D., Treharne, M. E., Ward et Clarke, I. N. (1991). Nucleotide sequence and taxonomic value of the major outer membrane protein gene of *C. pneumoniae*. IOL-207. *J. Gen. Micro.* 137: 465-475.

Chi, E. Y., C. C. Kuo, and J. T. Grayston. (1987). Unique ultrastructure in the elementary body of *Chlamydia* sp. strain TWAR. *J. Bact.* 169: 3757-3763.

Conlan, J. W., Clarke, I. N et Ward, M. E. (1998). Epitope mapping with solid-phase peptides: identification of type-, subspecies-, species- and genus-reactive antibody binding domains on the major outer membrane protein of *C. trachomatis*. *Mol. Micro.* 2:673-679.

Datta, P., Frost, E., Peeling, R., Masinde, Saj., Deslandes, S., Echelu, C., Wamola, I., Brunham, R. C.(1994). Ophthalmia neonatorum in a trachoma endemic area. *Sexually Transmitted Diseases*; 21: 1-4

Deloche, A., M. Gorny,.(1985). *Au coeur de nos artères*. Edition Denoël Paris. P. 190-199.

Dhir, S. P., Hakomori, G. E., Kenny and J. T. Grayston. (1992). Immunological studies on Chlamydial group antigen (presence of a 2-keto-3-deoxycarbohydrate as immunodominant group). *J. Immun.* 109: 116-122.

Dunlop, E. M.C., Jones, and Al-Hussaini M. K. (1964). Genital infection in association with TRIC virus infection of the eye. *Br. J. Vener. Dis.* 40: 33-42.

Erlich, H. E.(1989). *PCR technology. Principles and applications for DNA amplification*. Stockton. Press.

Forsey, T. S., Darougar and Treharne, T. D. (1986). Prevalence in human beings of antibodies to Chlamydia IOL-207, a typical strain of Chlamydia. *J. Infect. Dis.* 12: 1245-152.

Fritsch, H. O., Hosstatter A and Linder, K. (1910). Experimentelle studien zur trachomfrage (in german). Graefe's Archiv fur Ophtalmologie. 76: 547.

Frost, E., (1991). Mise en évidence de *C. trachomatis* : utilisation rationnelle des laboratoires. Le clinicien;6. P.117-128.

Frost, E., Deslandes, S., Veilleux, S., Bourgaux-Ramoisy, D., Bourgaux, P. (1991). Typing of *C. trachomatis* by detection of restriction fragment length polymorphism in the gene encoding the major outer membrane protein. J. Infec. Dis; 163: 1103-1107.

Frost, E., Deslandes. S., Bourgaux-Ramoisy, D., Bourgaux, P. (1993). Sensitive detection and typing of *C. trachomatis* using nested polymérase chain reaction. Genitourin Med; 69: 290-4

Frost, E., Deslandes, S., Bourgaux-Ramoisy, D., Bourgaux, P.(1993). *C. trachomatis* serovars in 435 urogenital specimens typed by restriction endonuclease analysis of amplified DNA. J. Infec. Dis; 168: 497-507.

Frost, E., Deslandes, S., Gendron, P., Bourgaux-Ramoisy, D., Bourgaux, P.(1995). Variation outside variable segments of the major outer membrane protein distinguishes trachoma from urogenital isolates of the same serovar of *C. trachomatis*. Geniturin Med: 71: 18-23.



Frost, E., Collet, M., Reniers, J., Leclerc, A., Ivanoff, B., Meheus, A. (1987). Importance of Chlamydial antibodies in acute salpingitis in central Africa. *Genitourin Med*; 63: 176-178

Furness, G., D. M. Graham, and P. Reeve. (1960). The titration of trachoma and inclusion blenorrhoeae viruses in cell culture. *J. Gen. Microbiol.* 23:613-619.

Gaydos, C. A., Quinn, T. C and Eiden, J. J. ( 1992). Identification of *C. pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA Gene. *J. Clin. Microbiol.* 30: 796-800.

Gaydos, C. A., Quinn, T. C., Bobo, D. L., and Eiden, J. J. (1992). Similarity of *C. pneumoniae* strain in the variable domain IV region of the major outer membrane protein gene. *Infect. Immun.*60: 5319-5323.

Gnarpe, J et Ericksson, K. (1995). Sample preparation for *C. pneumoniae* PCR. *APMIS* 103: 307-308.

Grayston, J. T.(1992). Infections caused by *C. pneumoniae* strain TWAR. *Clin. Infect. Dis.* 15: 757-763.

Grayston, J. T., V.K. Diwan., M. Cooney, and S.-P. Wang. (1989). Community and hospital-acquired pneumonia associated with *Chlamydia* TWAR infection demonstrated serologically. *Arch. Intern. Med.* 149: 169-173.

Grayston, J. T., M. B. Aldous., A. Easton., S. P. Wang., Kuo, C. C., Campbell, A. L. and J. Altman. (1993). Evidence that *C. pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. *J. Infect. Dis* 168: 1213-1235.

Grayston, J. T., C. C. Kuo., L. A. Campbell and Wang, S. P. (1989). *C. pneumoniae* Sp. nov. for Chlamydia Sp. strain TWAR. *Int. J. Syst. Bact.* 39: 88-90.

Grayston, J. T., Wang, S. P., C. C. Kuo., C. H. Mordhorst., P. Saikku., and Marrie, T. J. (1984). Seroepidemiology with TWAR, a new group of *C. psittaci*. *Abstr. 24<sup>th</sup> Intersci. Congr. Antimicro. Agents Chemother.* Washington, D.C. 290.

Grayston, J. T., L. A. Campbell., C. C. Kuo., C. Mordhorst., P. Saikku., D. H. Thom, and S. P. Wang. (1990). A new respiratory tract pathogen: *C. pneumoniae* strain TWAR. *J. Infect. Dis.* 161: 618-625.

Grayston, J. T., C. -C.. Kuo., S. -P. Wang, and J. Altman. (1986). A new *C. psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N. Engl. J. Med.* 315:161-168.

Gronhagen-Riska, C., P. Saikku., H. Riska., B. Froseth and J. T. Grayston. (1988). Antibodies to TWAR—a novel type of *C. -*in sarcoidosis, p. 297-301. In c. Grassi, G. Rizzato, and E. Pozzi (ed.), *Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders*. Excerpta Medica, New York.

Grundy, S. M. (1990). Cholesterol and atherosclerosis. J. B. Lippincott Company Philadelphia 24-28.

Hackstadt, T., Tood, W. J and Caldwell, H. D. (1985). Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of Chlamydiae. J. Bact. 161: 25-31.

Hahn, D. L., R. W. Dodge, and R. Golubjatnikov. (1991). Association of *C. pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult onset asthma. JAMA 266: 225-230

Halbertaeder, L. and Von Prowazek, S. (1909). Ueber Chlamydozoenbefunde bei Blennorrhoe neonatorum non-gonorrhoea (in German). Berlin. Klin. Wochenschr. 46: 1839-1840.

Hanahan, B. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.

Harnisch, P. J., Berger, R. E., E. R. Alexander, G. D. Mouda and Holmes, K. K. (1977). Etiology of acute epididymitis. Lancet ii: 819-821.

Hatch, T. P., Allan, I and Pearce, J. H. (1984). Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproduction life cycle forms of Chlamydia spp. J. Bact. 157: 13-20.

Holmes, D. S. and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197.

Holmes, K. K., Handsfiel, H. H., S. P. Wang., B. B. Wentworth., Turck, M., Anderson J. B. and Alexander E. R. (1975). Etiology of nongonococcal urethritis. *N. Engl. J. Med.* 292: 1199-1205.

Holmes, K. K. and Mardh, P. A. (1983). Eds. International perspective on neglected sexually transmitted diseases: Impact on venereology, fertility and infant health. Hemisphere Publishing, Washinton, D.C.

Holst, O., Brade, L., P. Kosma and Brade, H.(1991). Structure, serological specifity, and synthesis of artificial glycoconjugates representing the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia* spp. *J. Bact.* 173: 1862-1866.

Jaattela, M. et Wissing, D. (1992). Emerging role of shock proteins in biology and medecine. *Ann. Of. Med;* 24: 249-258

Jacob, H. S. (1994). Newly recognized causes of atherosclerosis: The rôle of microorganisms and of vascular iron overload. *J. Lab. Clin Med;* 123: 808-16.

Jones, B. R. (1964). Ocular syndromes of TRIC virus infection and their possible genital significance. *Br. Med. J. Vener. Dis.* 40: 3-15.

Jones, B. R., Collier, H. L. and Smith, C. H. (1959). Isolation of virus from inclusion blennorrhoea. *Lancet* ii: 902-905.

Kaltenboeck, B. Kousoulas, K. G et Storz, J. (1993). Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein ( ompA) genes of the four Chlamydial species. *J. Bacteriol*; 175: 487-502

Kamech, N., Fondat, C., Akli, S., Szajnert, M-F. (1993). Pcrbase: un logiciel d'aide à la PCR en interface avec les banques de séquences nucléiques. *Med. Sci*; 9: 1256-1261.

Kitchin, P. A., Bootman, J. S.(1993). Quality control of the polymerase chain reaction. *Med virol*. 40(3):107-114

Kikuta, C. L., Puolakkainen, M., Kuo, C et Campbell, L. A. (1991). Isolation and sequence analysis of *C. pneumoniae* GroE operon. *Infect. Immun*; 59: 4665-4669.

Kuo, C. C., Grayston, J. T., Campbell, L. A., Goo, A. T., Wissler, R. W., and Benditt, E. P. (1995). *C. pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 6911-6914.

Kuo, C. C., Jackson, L. A., Campbell, L. A., and Grayston, J. T. (1995). *C. pneumoniae* (TWAR). *Clin. Microbiol. Rev.* 8(4): 451-461.

Kuo, C. C., Shor, A., Campbell, L. E., Fukushi, H., Patton, D. L., and Grayston, J. T. (1993). Demonstration of *C. pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. J. Infect. Dis., 167: 814-849.

Koskenvuo, M. et K. Romanov (1989). *C. TWAR* and acute myocardial infarction. Lancet I : 158.

Kornak, J.M., Kuo, C.C. et Campbell, L.A. (1991)..Sequence analysis of the gene encoding the *C. pneumoniae* DnaK protein homolog. Infect. Immun;59: 721-725.

Kristensen, G. B., A. C. Bollerup, K. Lind, P. -A. Mardh, P. Ladehoff, S. Larsen, A. Marushak, P. Rasmussen, J. Rolschau, I. Scoven et I. Lind (1985). Infection with *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* in women with acute salpingitis. Genitourin. Med. 61: 179-184.

Leclerc, A., Frost, E., Collet, M., Goeman, J., Bedjabaga, L. (1988). Urogenital *C. trachomatis* in Gabon: an unrecognised epidemic. Genitourin. Med; 64:308-11

Le Gouil, G., Parent, J.-L., Rola-Pleszczynski, M. and Stankova Jana. (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. Analyt. Biochem. 219; 164.

Leinonen, M., E. Linnanmaki, K. Mattila, M. s. Nieminen, V. Valtonen, M. Leirisalo-Repo et P. Saikku (1990). Circulating immune complexes containing chlamydial lipopolysaccharide in acute myocardial infarction. *Microbial Pathogenesis* 9:67-73.

Levitt, D., Newcomb, R.S., Been, M. O (1983). Excessive numbers and activity of peripheral blood B cells in infants with *C. trachomatis*. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 29: 429-432.

Linnanmäki, E., Leinonen, M., Mattila, K., Niemien, M. S., Valtonen, V., and Saikku, P. (1993). *C. pneumoniae* - Specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. *Circulation* 87 (4): 1130-1134.

Lopes-Virella, M. F., and Virella, G. (1985). Immunological and microbiological factors in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Immunol. And Immunopathol.* 37:377-386.

Maass, M. Et Dalhoff, K. (1994). Comparison of sample preparation methods for detection of *C. pneumoniae* in bronchoalveolar. *Clin. Microbiol.* 32:2616-2619.

Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook, (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, N. Y.

Mardh, P.-A. (1986). Ascending chlamydial infection in the femal genital tract. In: *Chlamydial infections*. Oriel, J., Ridgway, G., Schaechter, J., Taylor-Robinson, D. and Ward, M. eds. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 173-184.

Marrie, T. J., Harczy, M. O. E., Mann, R. W., Landymore, A., Raza, S. P., Wang et Grayston, J. T. (1990). Culture negative endocarditis probably due to *C. pneumoniae*. J. Infect. Dis; 161: 1127-129.

Melgosa, M. P., C. C. Kuo and L. A. Campbell. (1991). Sequence analysis of the major outer membrane protein gene of *C. pneumoniae*. Infect. Immun. 59: 2195-2199.

Melnick, S., Shahar, E., Folsom, A. R., Grayston, J. T., Sorlie, P. D., Wang, S. P., and Szklo, M. (1993). Past infection by *C. pneumoniae* strain TWAR and asymptomatic carotid atherosclerosis. Am. J. Med, 95: 499-504.

Morrison, R. p., Su, H., Lynk, K et Yuan, Y. (1990). The *C. trachomatis* hyp operon is homologous to the groE stress response operon of *E. coli*. Infect. Immun; 58: 2701-2705.

Muhlestein, J. B., Hammond, E. H., Carlquist, J. F., Radicke, E., Thomson, M. T., Karagounis, L. A., Woods, M. L., Anderson, J. L. (1996). Increased incidence of *Chlamydia* species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. J. Am. Coll. Cardiol. ; 27, No 7: 1555-61

Osser, S. and Persson K. (1982). Postabortal pelvic infection associated with *C. trachomatis* and the influence of humoral immunity. Am. J. Obstet. Gynecol. 150: 699-703.

Patnode, D., Wang, S. P. and Grayston, J. T. (1990). Persistence of *C. pneumoniae*, strain TWAR microimmunofluorescent antibody, in Bowie, W.R., Caldwell, H. D., Jones, R. P.,



Mardh, P. A., Ridgway, G. L., and Ward, M. E. (eds): Chlamydial infections Cambridge, England, Cambridge University Press; 418-421.

Persson, K. (1986). Chlamydial infections. Aspects on epidemiology and immunity. Academic dissertation. University of Lund.

Persing, D. H. (1991) Polymerase chain reaction: Trenches to benches. J. Clin Micro; 29: 1281-1285.

Puolakkainen, M., Kuo, C., Shor, A., Wang, S., Grayston, J. T et Campbell, L. A. (1993). Serological response to *C. pneumoniae* in adults with coronary arterial fatty streak and fibrolipid plaques. J. Clin. Micro; 31: 2212-2214.

Quinn, T. C., (1994). Recent advances in diagnosis of sexually transmitted diseases. Sex. Transm. Dis. 21: S19-S27.

Reniers J, Collet M, Frost E, Leclerc A, Ivanoff B, Méheus A. Chlamydial antibodies and tubal infertility.(1989). Inter of epidemiol; 18: 261-263.

Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmäki, E., Ekman, M. R., Manninen, V., Mänttari, M., Frick, M. H., and Huttunen, J. K (1992). Chronic *C. pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. Annals Int Med 116 (4): 273-278.

Saikku, P., K. Mattila, and M. S. Nieminen. (1988). Serological evidence of an association of a novel *C.*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* ii: 983-986.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring harbor Laboratory Cold Spring Harbor, N. Y.

Schachter, J., Grossman, M. :Azimi, P. M. (1982). Serology of *C. trachomatis* in infants. *J. Infect. Dis.* 146: 530-535

Stephens, R. S. and Kuo, C. C. (1984). *C. trachomatis* species-specific epitope detected on mouse biovar outer membrane protein. *Infect. Immun.* 45:790-791.

Taylor, H.R., Maclean, I. W., Brunham, S. P. et Whittum-Hudson, J. (1990). Chlamydial heat shock proteins and trachoma. *Infect. Immun.* 58: 3061-3063.

Thom, D. H., Grayston, J. T., Siscovick, D. S., Wang, S. P., Weiss, N. S., Daling, J. R. (1992). Association of prior infection with *C. pneumoniae* and angiographically demonstrated coronary artery disease. *JAMA* 268(1): 68-72.

Thom, D. H., Grayston, J. T., Wang, S. P., Kuo, C.C. and Altman, J. (1990). *C. pneumoniae* strain TWAR, Mycoplasma pneumoniae and viral infections in acute respiratory disease in a university student health clinic population. Am. J. Epidemiol; 132: 248-256.

Thom, D. H., Wang, S. P. and Grayston, J. T. (1991). *C. pneumoniae* strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery diseases. Atheroscl. Thromb. 11: 547-551.

Wang, S. P., Kuo, C.C., Barnes, R.C., S. Stephens and J. T. Grayston. (1985). Immunotyping of *C. trachomatis* with monoclonal antibodies. J. Infect. Dis. 152(4): 791-799.

Wang, S. P. and Grayston, J. T. (1970). Immunologic relationship between genital TRIC, lymphoma granuloma venereum and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. Amer. J. Ophtal. 70: 367-374.

Wang, S. P. and Grayston, J. T. (1990). Population prevalence antibody to *C. pneumoniae* strain TWAR, in in Bowie, W.R., Caldwell, H. D., Jones, R. P., Mardh, P. A., Ridgway, G. L., and Ward, M. E. (eds): Chlamydial infections Cambridge, England, Cambridge University Press; 402-405.

Wang, S. P. and Grayston, J. T. (1991). *C. pneumoniae* elementary body antigenic reactivity with fluorescent antibody is destroyed by methanol. J. Clin. Micro. 29 (7): 1539-1541.

Zhang, Y. X., Morrison, S. G., Caldwell, H. D and Baehr, W. (1989). Cloning and sequence analysis of the major outer membrane protein genes of two *C. psittaci* strains. *Infect. Immun*; 57: 1621-1625.

Zhong, G. et Brunham, R. C. (1992). Antibody responses to the Chlamydial heat shock proteins hsp60 and hsp70 are H-2 linked. *Infect. Immun*. 60: 3143-3149.

## **REMERCIEMENTS.**

J'adresse mes remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, que ce soit par leur enseignement, leurs conseils ou leur encouragement, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

En particulier au Dr Éric Frost qui m'a si gentiment accueillie dans son laboratoire et qui m'a donné la possibilité d'accéder à la connaissance et à toute l'instrumentation nécessaires à la réalisation de ce travail

Je remercie sincèrement Sylvie Deslandes qui m'a grandement facilité la tâche par son large éventail de connaissances, par sa disponibilité constante et par le travail accompli tout au long de ma maîtrise.

Je désire adresser mes remerciements à tous les membres du département de microbiologie, en particulier Dr Thirion et Louis Delbecchi pour les discussions scientifiques enrichissantes et pour l'agréable atmosphère qu'ils ont su créer.

Je remercie également tout les membres du jury, Dr Éric Frost, Dr Jean-Paul Thirion et Dr Guylain Boissonneault. d'avoir accepté de prendre de leur temps pour évaluer cette thèse.

Je tiens à souligner la contribution de l'état Gabonais pour son soutien financier.

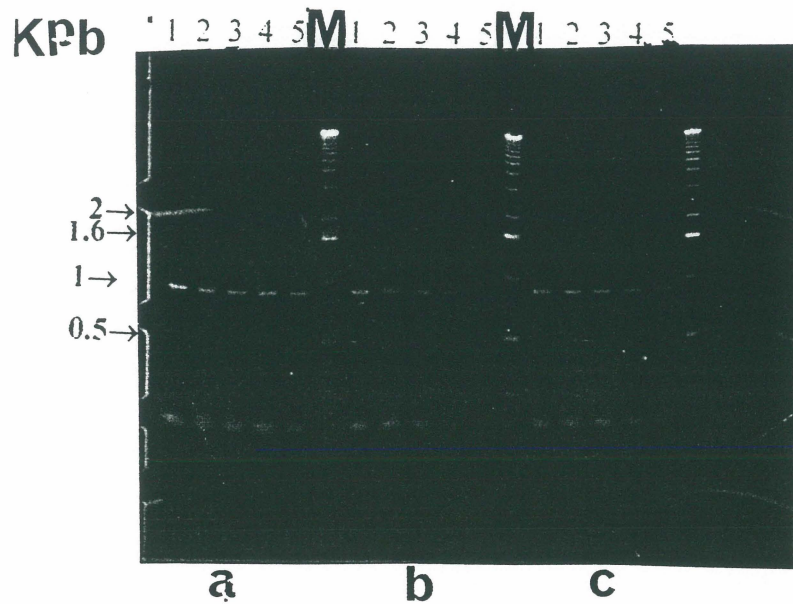
J'aimerais mentionner l'appui moral et affectif dont mon fiancé Nze Bekale Justin n'a cessé de me témoigner tout au long de ma maîtrise ainsi que mon fils Ollomo Davey Stéphane.

Mes remerciements les plus spéciaux vont à mon grand Frère Tomo Ernest et à ma défunte mère Ntsame Assoumou Madeleine, car grâce à eux j'ai pu franchir toutes les étapes qui m'ont conduisent jusqu'à l'obtention de ce diplôme.

Et enfin je dédie ce diplôme à ces deux personnes :

-Ntsame Assoumou Madeleine ( ma défunte mère )

-Tomo Ernest mon cher grand frère.



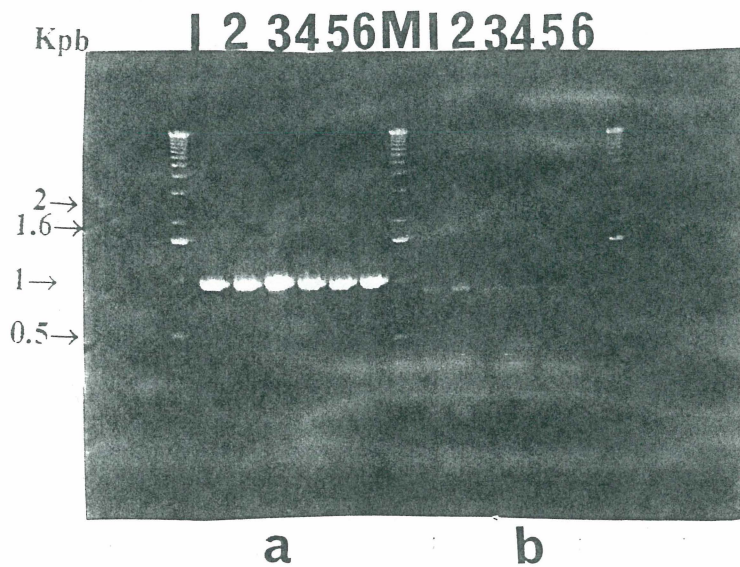
**figure 1:** Amplification par PCR de l'ADN obtenu avec différentes méthodes

Une préparation de *C. pneumoniae* produit en culture de tissus a été dilué dans un extrait de cellules McCoy et extrait par une des trois techniques puis amplifiés par PCR avec les amorces CT12 et CT5b:

a)- méthode NaOH 80° C

b)- méthode NaOH 95° C

c)- méthode PK lysis. La piste 1, la dilution  $10^{-5}$  particules bactériennes; la piste 2,  $10^{-7}$ ; la piste 3,  $10^{-8}$ ; la piste 4,  $10^{-9}$  et la piste 5, la dilution  $10^{-10}$ . La piste M contient le marqueur de poids moléculaire en Kpb (Kilo paires de bases).



**Figure 2A:** Impact de la variation de la concentration de  $\text{MgCl}_2$  sur l'amplification par PCR d'une préparation de *C. pneumoniae* (dilution  $10^{-2}$ ) produit en culture de cellules et extrait au  $\text{NaOH}$   $80^\circ\text{C}$ :

a) En a, l'amplification par PCR du gène PPME avec les amorces CT3B et CT8B pour le PCR externe suivie de la paire CT12-CT11 pour l'interne.

b) En b, l'amplification par PCR du gène PPME avec les amorces CT12 et CT5B.

les pistes 1 en a) et en b) contiennent la concentration de  $0.75 \mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$

les pistes 2 en a) et en b):  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ .

Les pistes 3 en a) et en b):  $1.5 \mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ .

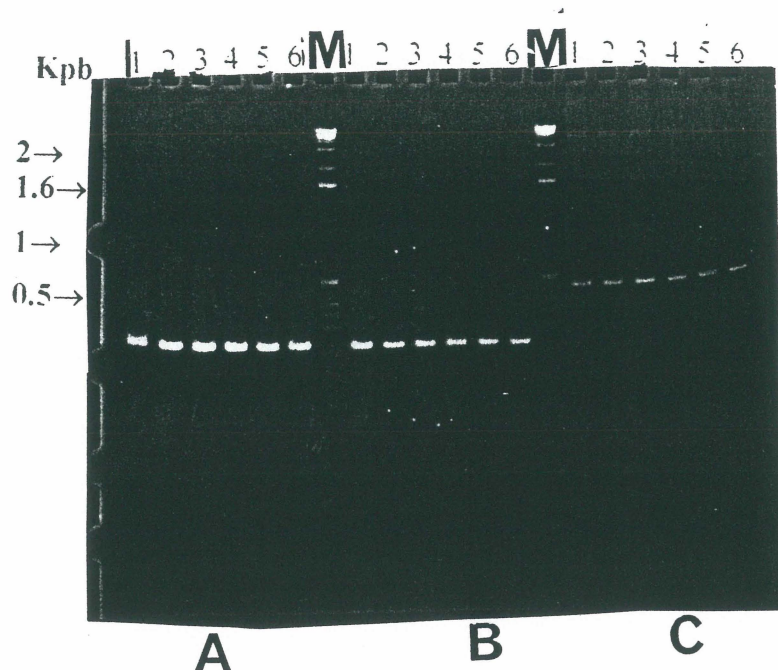
les pistes 4 en a) et en b):  $2 \mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ .

les pistes 5 en a) et en b):  $2.5 \mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ .

les pistes 6 en a) et en b):  $3 \mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ .

La piste M contient le marqueur de poids moléculaire en Kpb.





**Figure 2B:** Impact de la variation de la concentration de  $MgCl_2$  sur l'amplification par PCR d'une préparation de *C. pneumoniae*.

- A) Amplification du gène inconnu décrit par Campbell par la paire CpHR1 et CpHL1 pour le premier PCR, avec une concentration de  $0.75\mu M$  suivi de la deuxième paire CpHR1 et CpHM1, avec les différentes concentrations de  $MgCl_2$ .
- B) Amplification du gène inconnu décrit par Campbell par la paire CpHR1 et CpHL1 pour le premier PCR, avec une concentration de  $1.5\mu M$  suivi de la deuxième paire CpHR1 et CpHM1, avec les différentes concentrations de  $MgCl_2$ .
- C) Amplification par la paire d'amorce CpnB et CpnA en C:

les pistes 1 en a) et en b) contiennent la concentration de  $0.75\mu M$  de  $MgCl_2$

les pistes 2 en a) et en b) :  $1\mu M$  de  $MgCl_2$ .

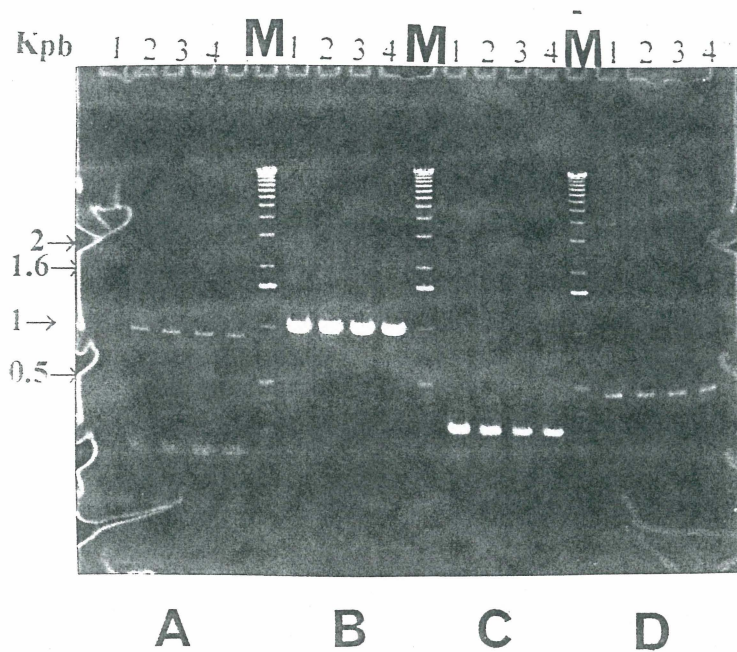
Les pistes 3 en a) et en b) :  $1.5\mu M$  de  $MgCl_2$ .

les pistes 4 en a) et en b):  $2\mu M$  de  $MgCl_2$ .

les pistes 5 en a) et en b):  $2.5\mu M$  de  $MgCl_2$ .

les pistes 6 en a) et en b):  $3\mu M$  de  $MgCl_2$ .

La piste M contient le marqueur de poids moléculaire en Kpb.



**Figure 3:** Influence de la variation de la concentration des dNTPs sur l'amplification par PCR de *C. pneumoniae* :

- a) en a, l'amplification par PCR du gène PPME avec les amorces CT12 et CT5B.
- b) en b, l'amplification par PCR du gène PPME avec les amorces CT3B et CT8B pour le PCR externe suivi de la paire CT12-CT11 pour l'interne.
- c) en c, l'amplification du gène inconnu décrit par Campbell avec les CpHR1 et CpHL1 pour le premier PCR, suivie de la deuxième paire CpHR1-CpHM1.
- d) en d, l'amplification par PCR du gène 16S ribosomal avec la paire d'amorce CpnB-CpnA

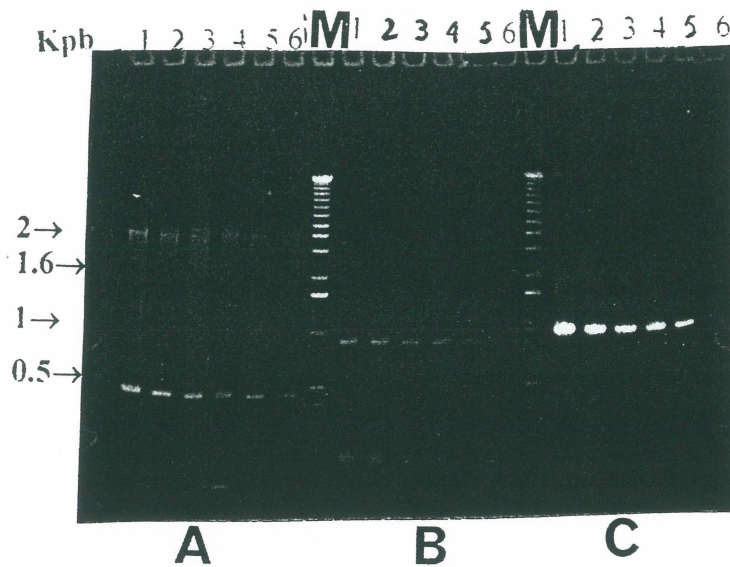
les pistes 1 en a), en b), en c), et en d) contiennent la concentration de 100µM de dNTPs

les pistes 2 en a), en b), en c), et en d), :200 µM de dNTPs.

les pistes 3 en a), en b), en c) et en d) :300 µM de dNTPs

les pistes 4 en a), en b), en c) et en d), 400 µM de dNTPs

la piste M contient le marqueur de poids moléculaire en Kpb



**Figure 4:** Étude de la sensibilité des paires d'amorces sur les dilutions d'extraits bactériens.

a) en a, l'amplification du gène 16S ribosomal par PCR avec les amorces CpnB et CpnA

b) l'amplification par PCR du gène *ppme*<sup>+</sup> avec les amorces CT12 et CT5B

c) l'amplification par PCR du gène *ppme*<sup>+</sup> avec les amorces CT3B et CT8B pour le PCR externe suivi de la paire CT12-CT11 pour l'interne:

les pistes 1 en a), en b) et en c) contiennent la dilution de  $10^{-5}$

les pistes 2 en a), en b), et en c): la dilution de l'extrait bactérien de  $10^{-7}$

les pistes 3 en a), en b), et en c): la dilution de l'extrait bactérien de  $10^{-9}$

les pistes 4 en a), en b) et en c): la dilution de l'extrait bactérien de  $10^{-10}$

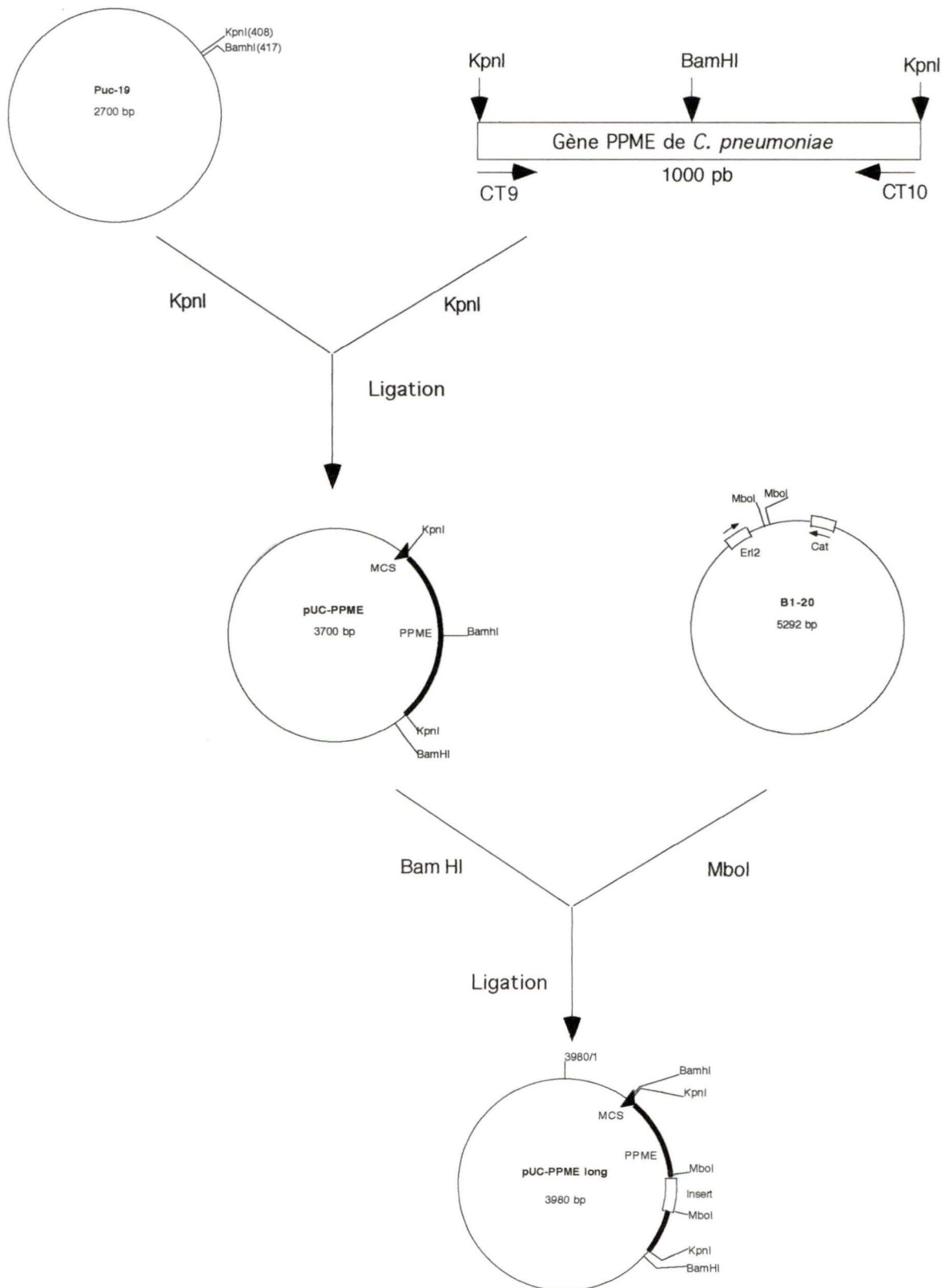
les pistes 5 en a), en b) et en c): la dilution de l'extrait bactérien de  $10^{-11}$

les pistes 6 en a), en b), et en c): la dilution de l'extrait bactérien de  $10^{-12}$

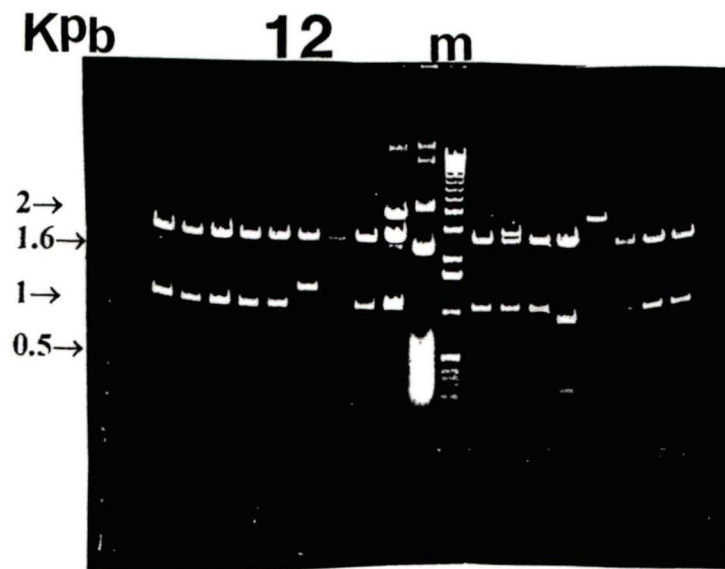
la piste M contient le marqueur de poids moléculaire en Kpb.

**Figure5** Construction de pUC PPME long par clonage

## 5- Construction de pUC PPME long par clonage







**Figure 6:** Mise en évidence du clone ayant incorporé l'insert, à l'aide du profil des fragments d'ADN générés par Kpn1 sur les différentes colonies. La piste 2 contient le clone positif de 1280 paires de bases ayant incorporé l'insert de 280 paires de bases dans son petit fragment d'environ 1000 paires de bases, tandis qu'à la piste 1 on retrouve le plasmide original avec son petit fragment de 1000 paires de bases.



Figure7

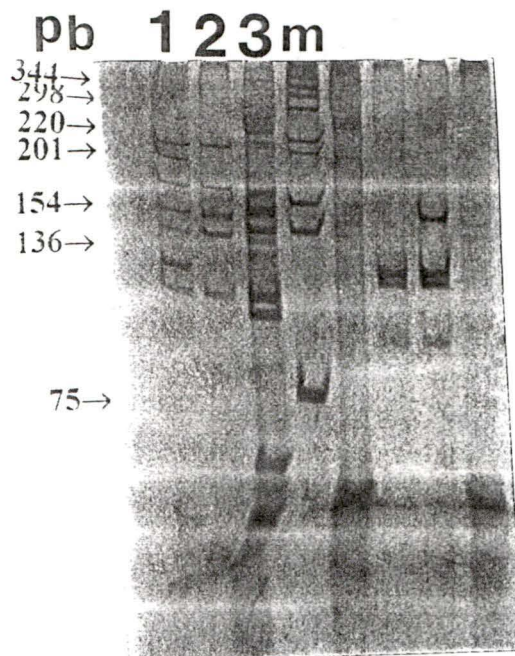


Figure 8

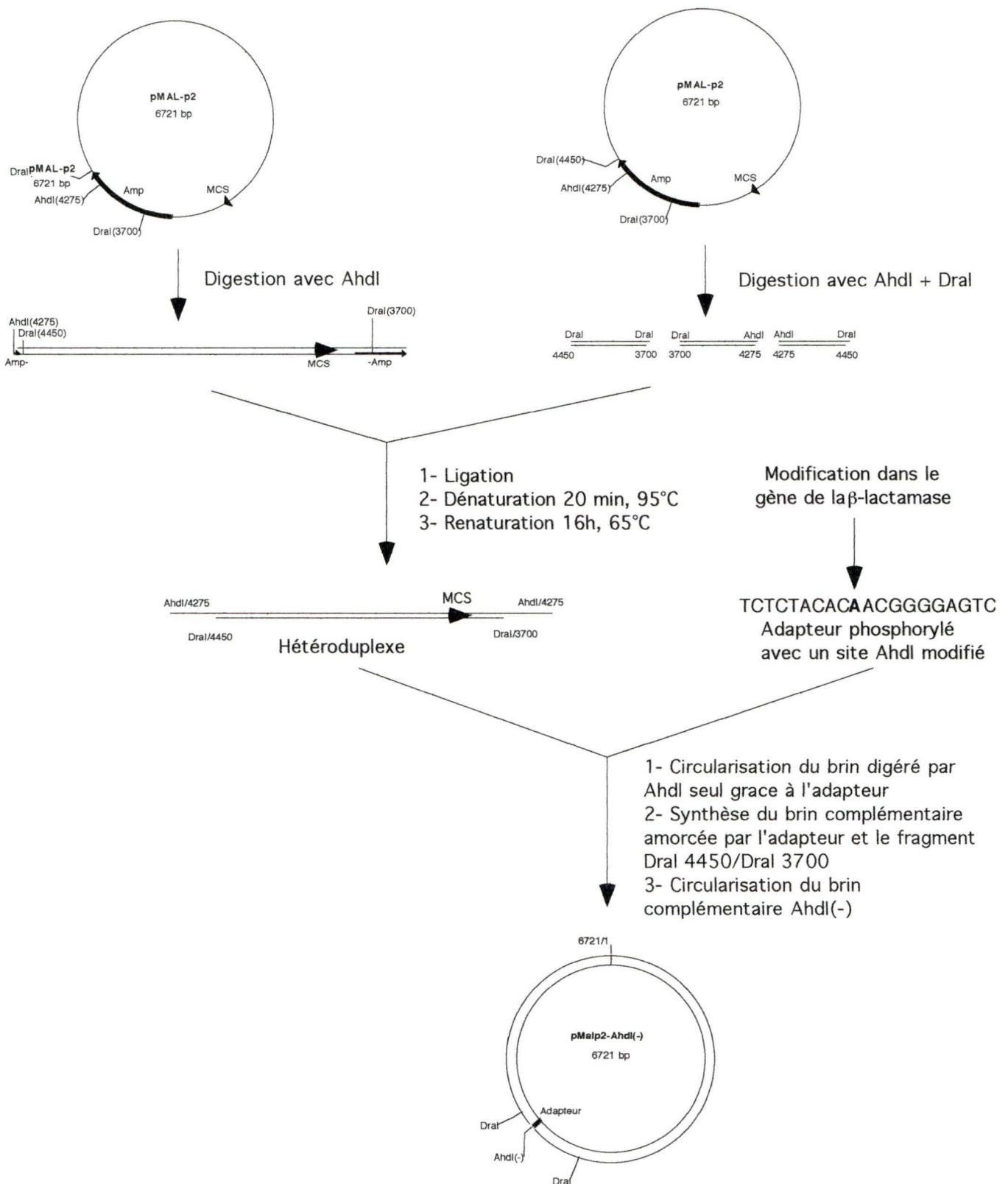
**Figure7:** L'amplification par PCR avec les amorces CT11 et CT12 du plasmide portant le gène *ppme*<sup>+</sup> de *C. pneumoniae* avec un insert de 280 pb ( piste 1) ou le plasmide original sans insert (piste 2). La piste m contient le marqueur de poids moléculaire

**Figure 8:** Confirmation de l'identité du plasmide portant le gène *ppme*<sup>+</sup> avec un insert de 280 pb par digestion de l'ADN amplifié avec les amorces CT12 et CT11 avec *Msp*I et *Alu*I: la piste 3 contient l'ADN amplifié de la souche L2 de *C. trachomatis*; la piste 2 l'amplicon de pUC-PPME (notre plasmide original); la piste 1 l'amplicon de pUC-PPME long

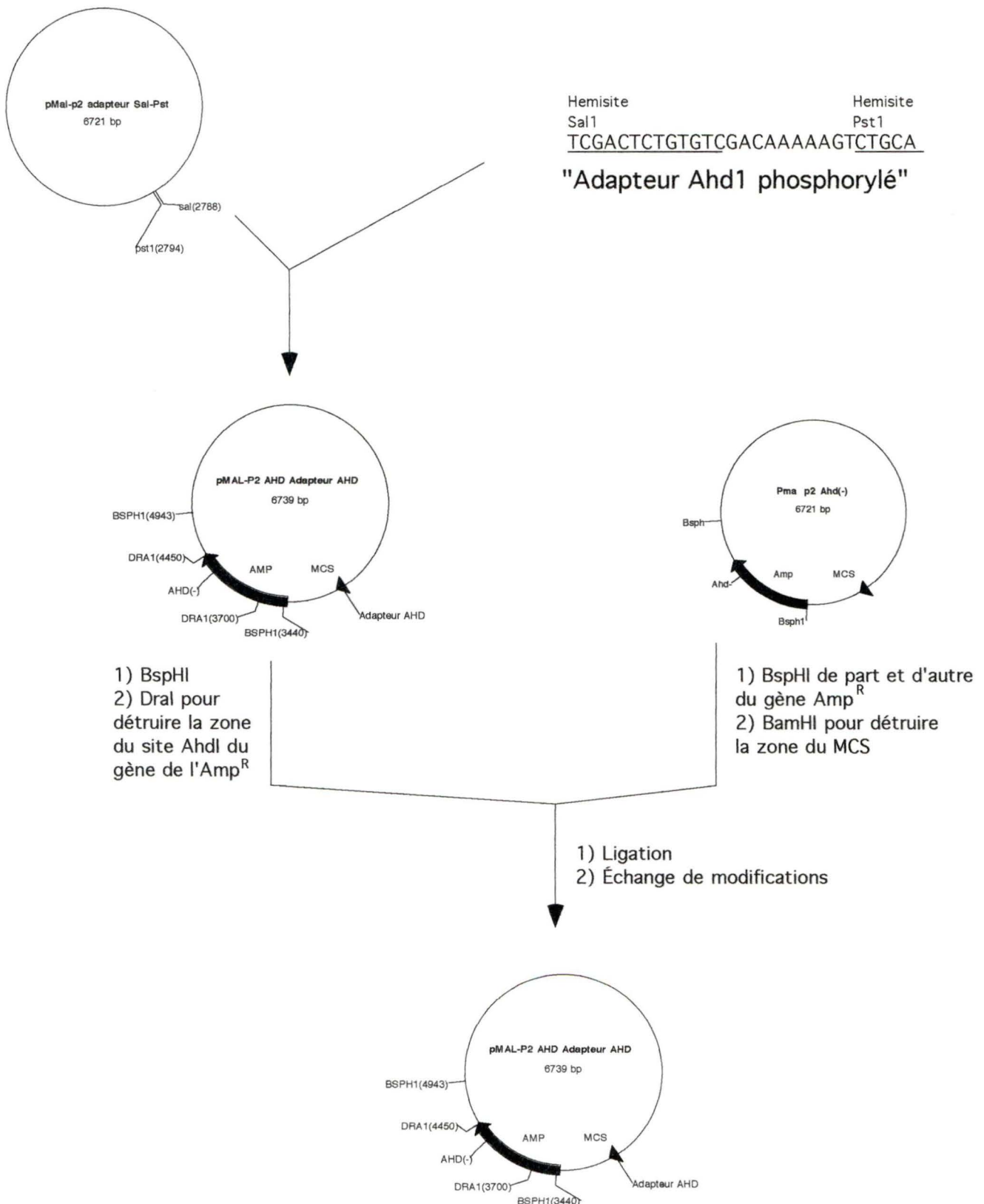
**Figure 9:** Construction du clone positif pUC-ADNr par Clonage du petit fragment de 436 paires de bases du gène ribosomal 16S issu d'une amplification par PCR avec les amorces CpnB et CpnA dans le plasmide universel, pUC AhD<sup>+</sup> 2 adaptateurs.



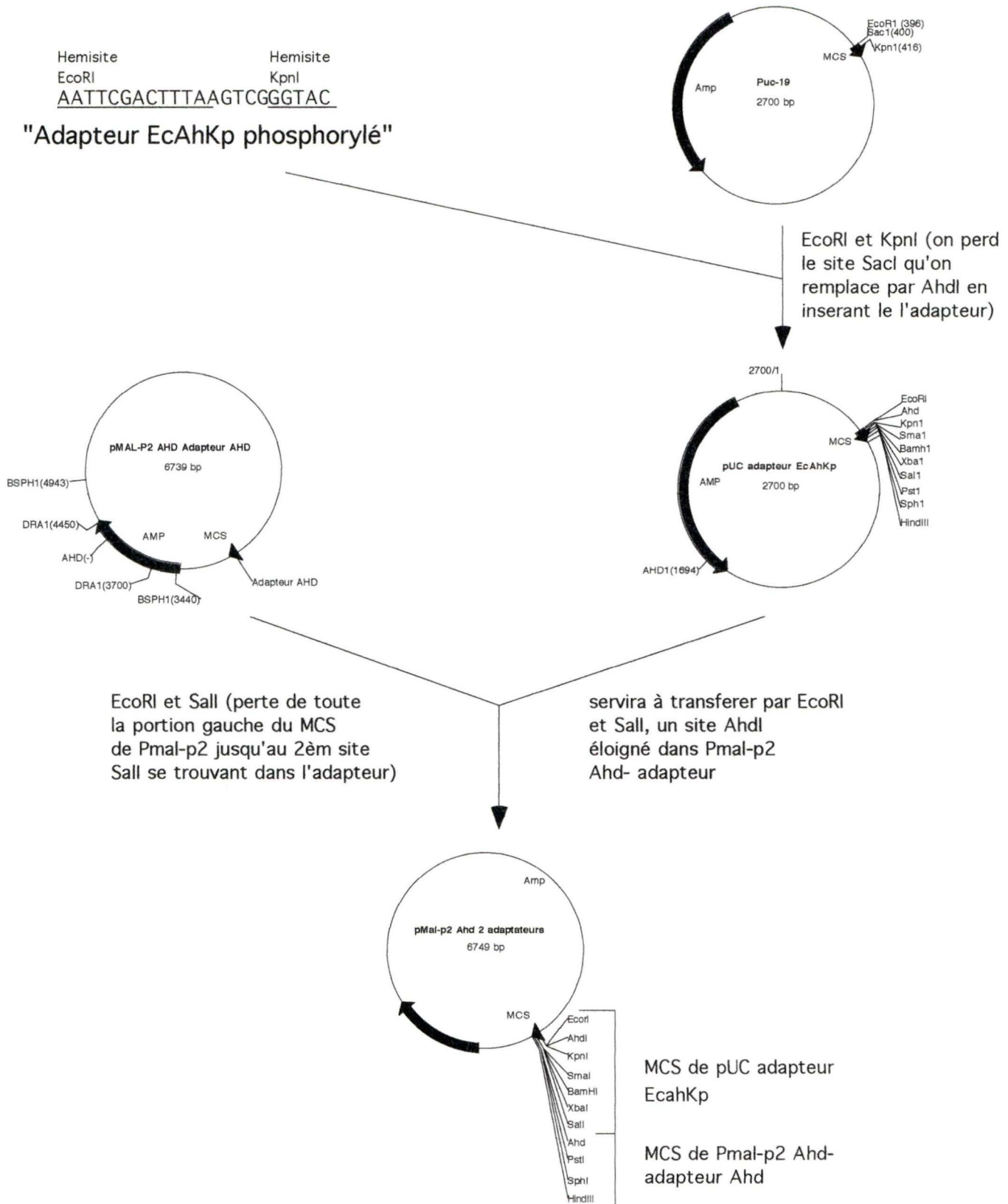
# 1- Création de pMAL-p2 Ahdl(-)



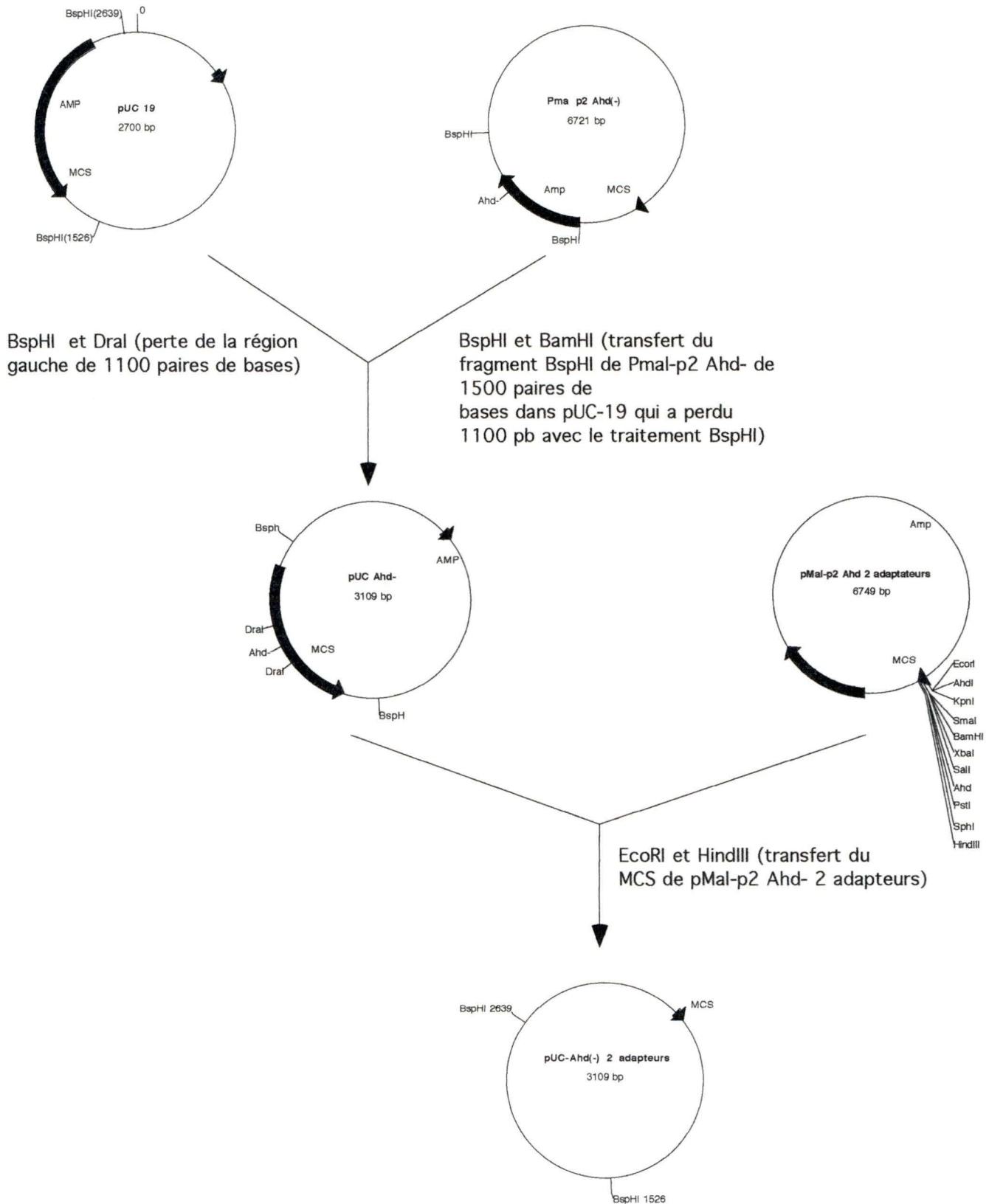
2- Création d'un site Ahd1 par un échange des modifications de pMAL-p2 Ahd- dans pMAL-p2 et obtention d'un pMAL-p2 Ahd- Adapteur Ahd



### 3- Création d'un deuxième site Ahd dans pMAL-p2 Ahd- adaptateur Ahd et obtention de pMAL-p2 Ahd- 2 adaptateurs



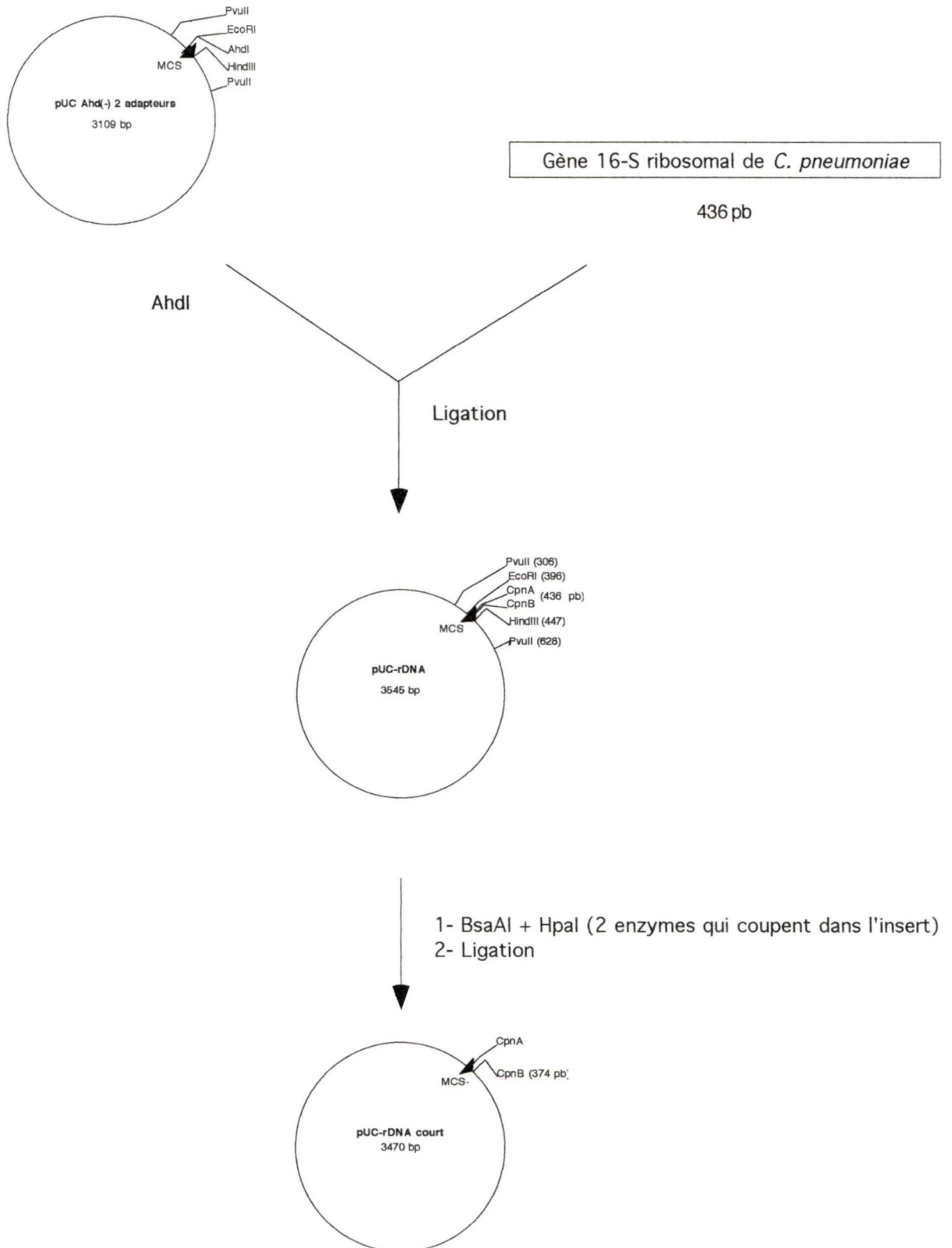
#### 4- Transfert des 2 sites Ahd de pMAL-p2 Ahd- dans pUC-19 et création de pUC vecteur PCR

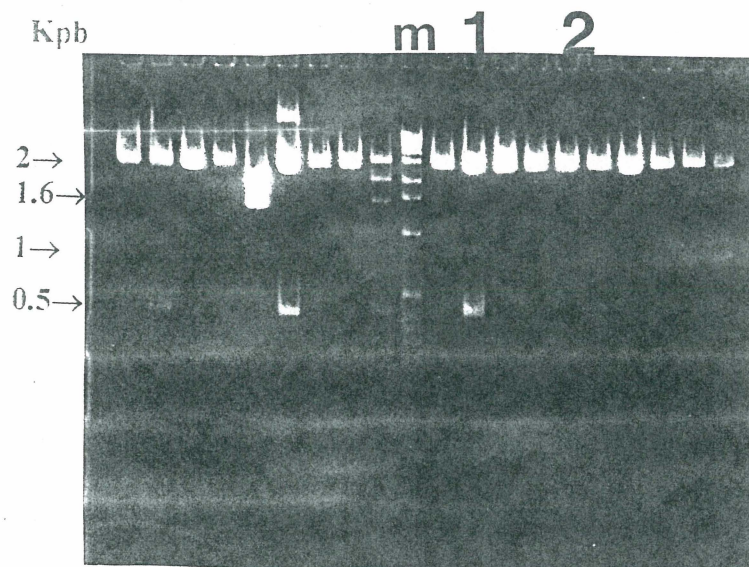


**Figure 9B:** Construction du plasmide pUC ADNr

**Figure 9C: Construction de pUC ADNr court par délétion**

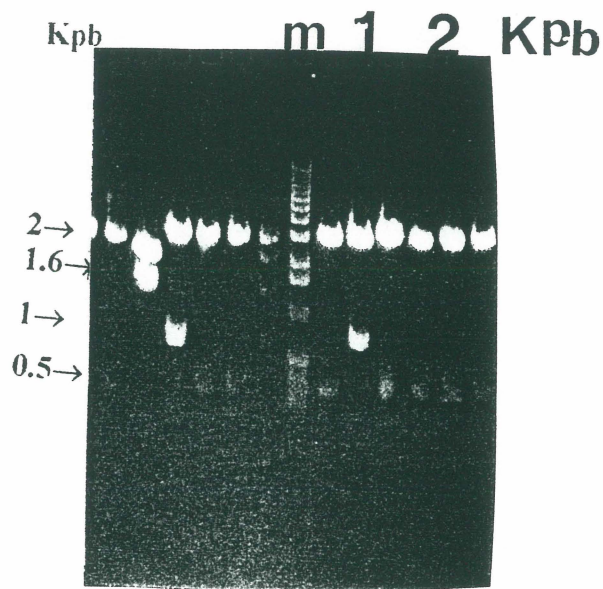
Clonage du gène 16-S ribosomal rDNA de  
*C. pneumoniae* dans le plasmide pUC  
vecteur PCR ou pUC Ahd- 2 adaptateurs





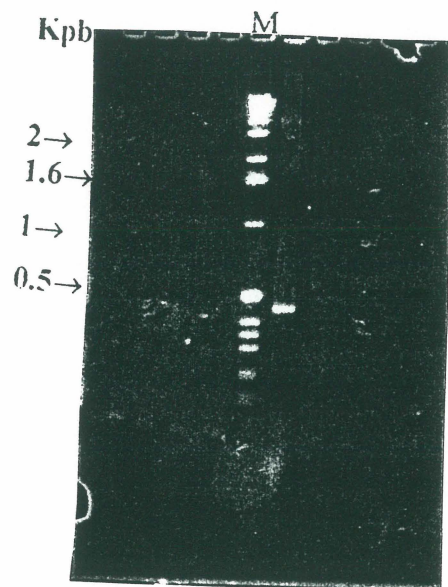
**Figure 10:** Mise en évidence du plasmide ayant incorporé l'ADNr de *C. pneumoniae* à l'aide du profil des fragments d'ADN générés par EcoRI et HindIII sur les différentes colonies. La piste 1 contient le recombinant positif ayant incorporé l'insert de 436 paires de bases dans le site de clonage multiple du plasmide tandis qu'à la piste 2 on retrouve le plasmide original. La piste M contient le marqueur de poids moléculaire.





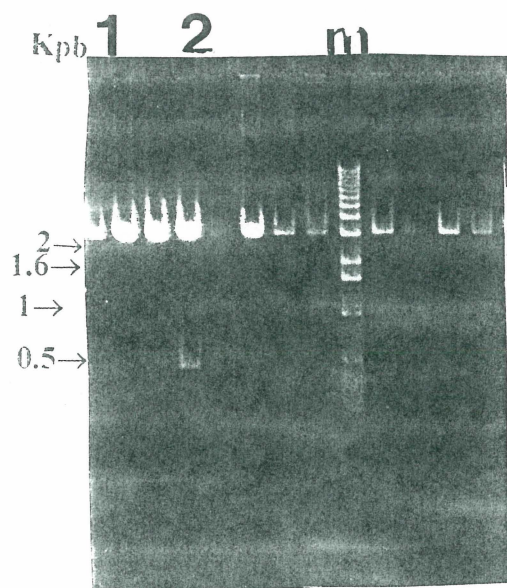
**Figure 11**

**Figure 11:** Electrophorèse sur gel d'agarose 1% qui confirme l'identité du clone pUC-ADNr par le traitement avec l'enzyme PvuII, la piste 2 contient le plasmide original; la piste 1, le clone portant l'ADN de l'ADNr de *C. pneumoniae*. La piste M contient le marqueur de poids moléculaire.



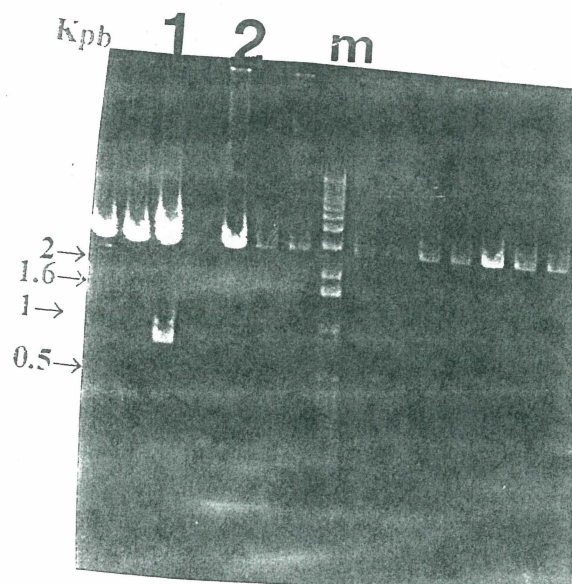
**Figure 12**

**Figure 12::** Electrophorèse sur gel d'acrylamide (12%) du produit d'amplification par PCR avec les amorces CpnB et CpnA du clone pUC-ADNr obtenu qui montre un fragment de 436 paires de bases (piste à droite de M), absent chez le plasmide d'origine (piste à gauche de M). La piste M contient le marqueur de poids moléculaire.



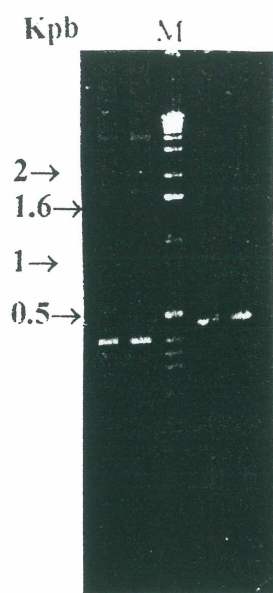
**Figure 13**

**Figure 13:** Mise en évidence par traitement avec EcoRI et HindIII d'un plasmide portant l'ADNr de *C. pneumoniae* ayant subi une délétion. La piste 1 contient le plasmide recombinant avec un insert de 374 paires de bases qui témoigne d'une délétion. La piste M contient le marqueur de poids moléculaire.

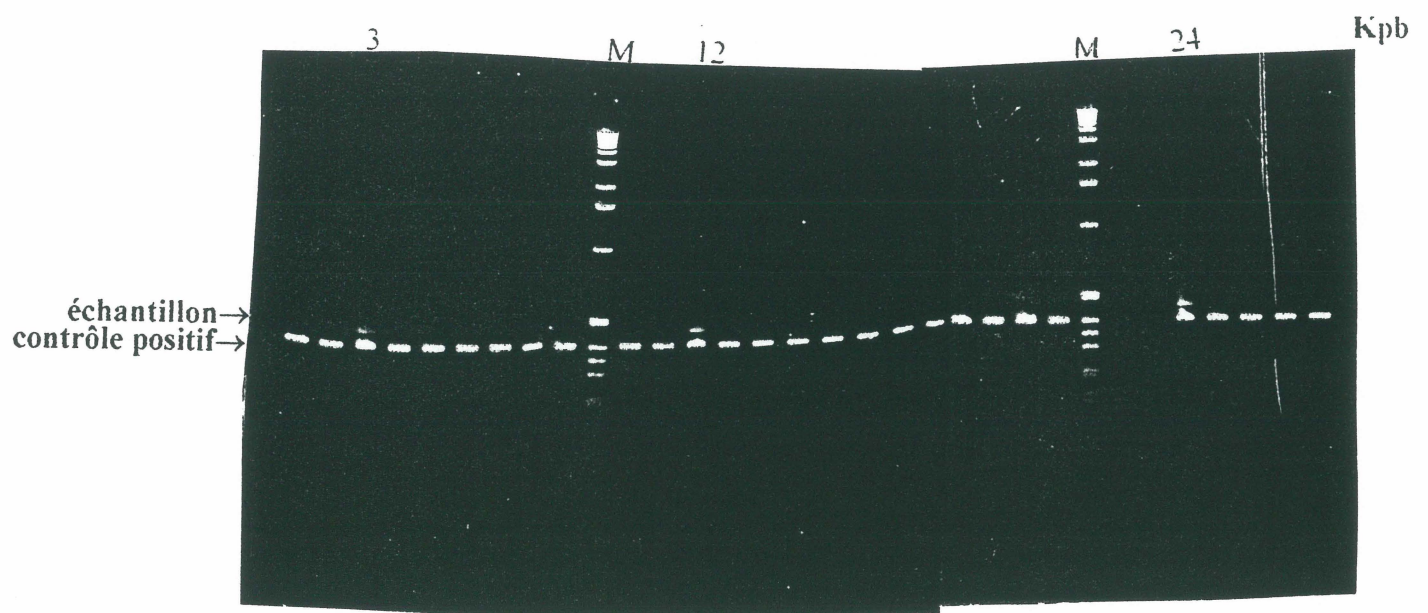


**Figure 14**

**Figure 14:** Électrophorèse sur gel d'agarose 2% qui confirme l'identité du clone pUC-ADNr par le traitement avec l'enzyme PvuII, la piste 1, le clone pUC-ADNr court. La piste M contient le marqueur de poids moléculaire.

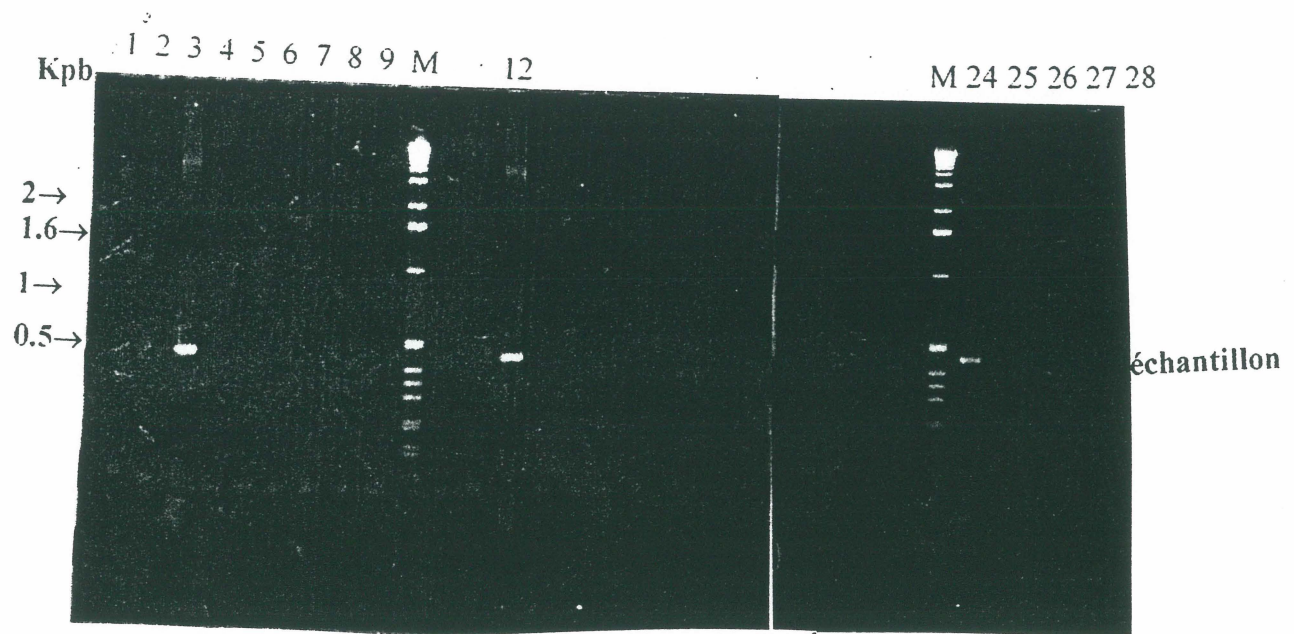


**Figure 15:** Électrophorèse sur gel d'agarose 2% du produit d'amplification par PCR avec les amorces CpnB et CpnA du clone pUC-ADNr court qui montre un fragment de 374 paires de bases (deux pistes à gauche), et du clone pUC ADNr dont est issu pUC-ADNr court et qui par amplification avec la même paire d'amorces, montre un fragment de 436 paires de base (deux pistes à droite). La piste M contient le marqueur de poids moléculaire.

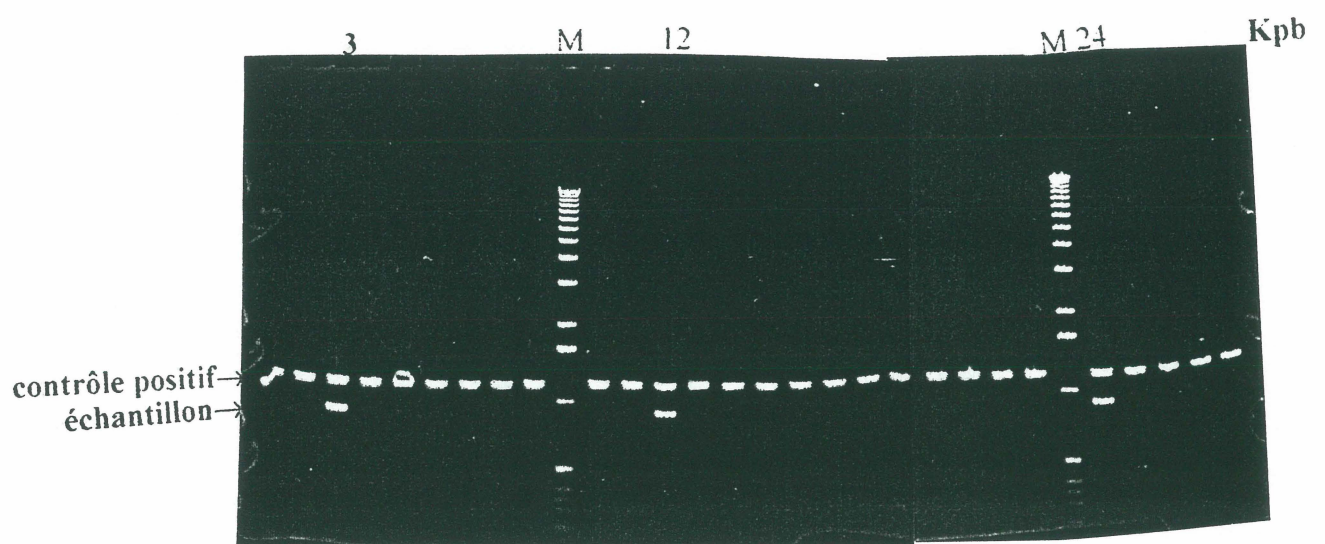


**Figure 16:** Électrophorèse sur gel d'agarose 2% du produit d'amplification avec la paire d'amorces CpnA et CpnB d'une série d'échantillons. 100 copies du contrôle positif pUC-ADNr court ont été ajoutées à chaque spécimen de sécrétions respiratoires. Les pistes 3, 12, et 24 montrent des patients positifs pour *C. pneumoniae* dans leurs sécrétions respiratoires. La piste M contient le marqueur de poids moléculaire.

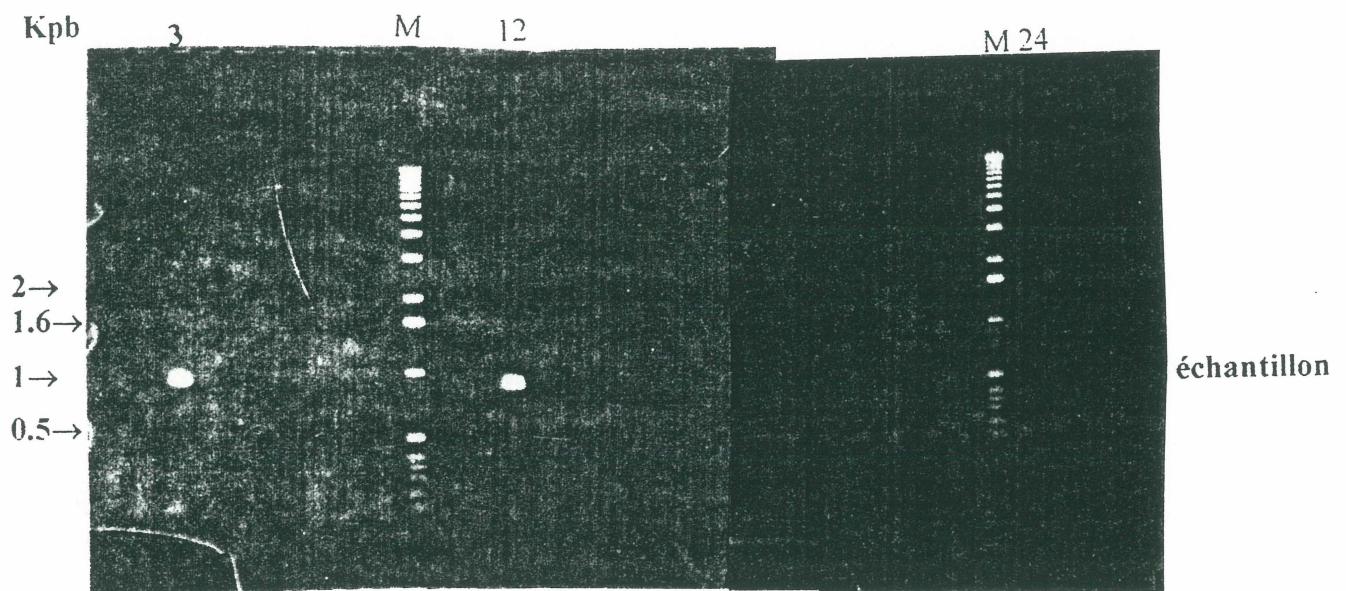




**Figure 17:** Electrophorèse sur gel d'agarose 2% du produit d'amplification avec la paire d'amorces CpnA et CpnB des mêmes échantillons présentés à la figure 16 mais sans contrôle positif. Les pistes 3, 12, et 24 montrent des patients positifs avec *C. pneumoniae* dans leurs sécrétions respiratoires. La piste M contient le marqueur de poids moléculaire

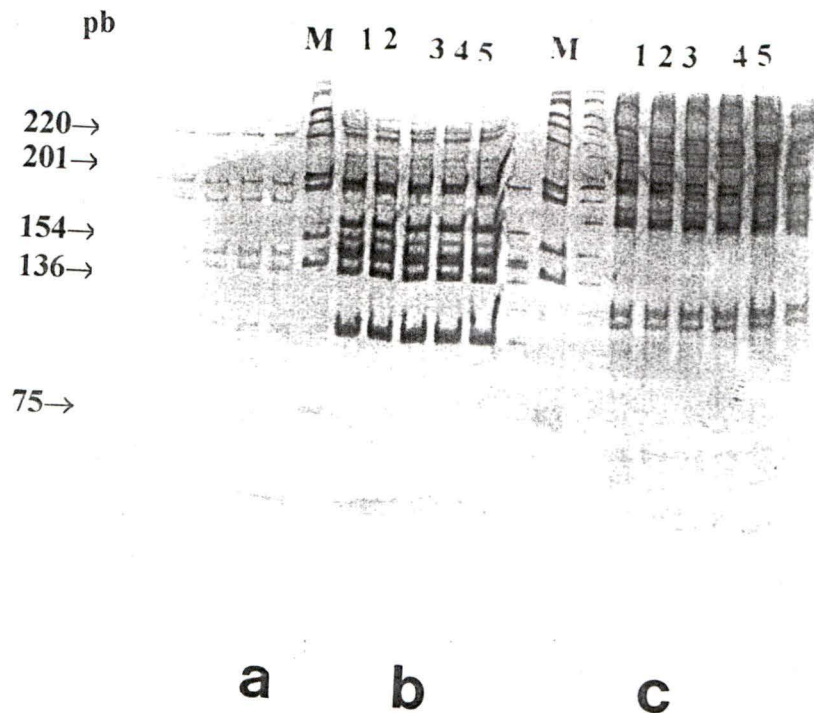


**Figure18:** Electrophorèse sur gel d'agarose 1% du produit d'amplification du gène  $ppme^+$  avec la paire d'amorces CT3B et CT8B, suivies de CT12 et CT5B, des échantillons présentés à la figure 16. 100 copies du contrôle positifs pUC-PPME long ont été ajoutées à chaque spécimen de sécrétions. Les pistes 3, 12, et 24 montrent des sécrétions respiratoires positives pour *C. pneumoniae*. La piste M contient le marqueur de poids moléculaire.



**Figure19:** Électrophorèse sur gel d'agarose 1% du produit d'amplification avec la paire d'amorces CT3B et CT8B suivies de CT12 et CT5B, des échantillons présentés à la figure 16, mais sans contrôle positif. Les pistes 3 et 12 montrent des patients positifs pour *C. pneumoniae* dans leurs sécrétions respiratoires, tandis que le patient 24 qui était toujours positif avec CpnA et CpnB, sans témoin positif, et avec CT12 et CT5B avec contrôle positif, s'est avéré négatif ici. La piste M contient le marqueur de poids moléculaire.





**FIGURE 20:** La caractérisation de l'ADN amplifié à partir des sécrétions respiratoires des patients par PCR avec les amorces CT3b et CT8b, suivies de CT12 et CT5b en a); en b) les paires CT3B et CT8B, suivies de CT12 et CT11; en c) la paire CpnA et CpnB. L'ADN est digéré par les enzymes MspI et AluI et les fragments sont séparés sur gel de polyacrylamide 10%. Les DNAs sont colorées à l'argent.

les pistes 1 en a), en b) et en c) le patient numéro 3

les pistes 2 en a), en b), et en c) le patient numéro 12

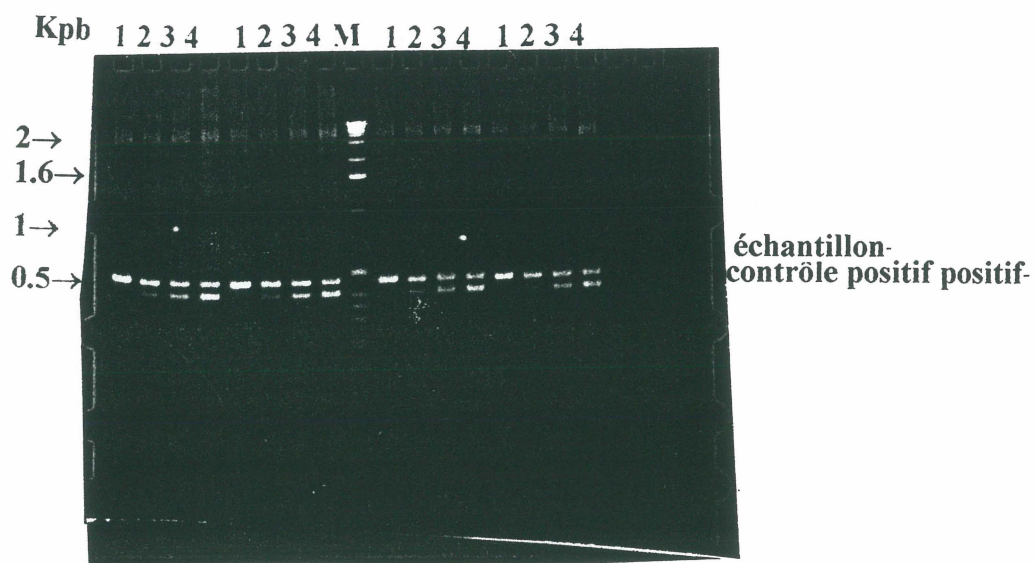
les pistes 3 en a), en b), et en c) : le patient numéro 24

les pistes 4 en a), en b) et en c), le patient numéro 51

Les pistes 5 en a), en b) et en c), proviennent d'une souche concentrée de TWAR amplifiée par les mêmes paires d'amorces en a), en b) et en c) respectivement.

La piste M contient les marqueurs de poids moléculaire.





**Figure 21:** Electrophorèse sur gel d'agarose 2% de la quantification de l'ADN de quatre échantillons des patients extraits par la méthode NaOH décrite au paragraphe 7.1.2. L'extrait est dilué 10 fois puis amplifié par CpnA et CpnB avec 0, 10, 100 et 500 copies du contrôle positif sur les pistes 1, 2, 3, 4 respectivement. La piste M contient les marqueurs de poids moléculaire.